
Naudan vetimen morfometria

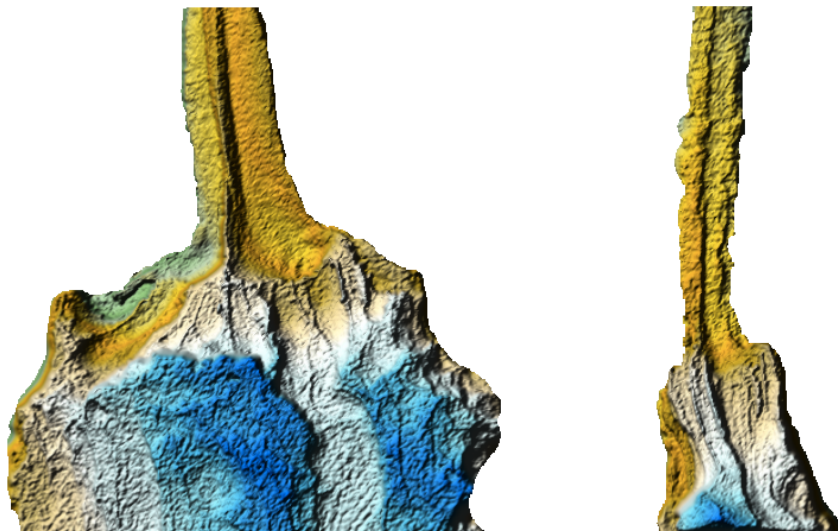
Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

Heidi Vesterinen 2011

Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto, Anatomia ja kehitysbiologia

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto





Tiedekunta - Fakultet – Faculty		Osasto - Avdelning – Department	
Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto	
Tekijä - Författare – Author			
Heidi Vesterinen			
Työn nimi - Arbetets titel – Title			
Naudan vetimen morfometria			
Oppiaine - Läroämne – Subject			
Anatomia ja kehitysbiologia			
Työn laji - Arbetets art – Level		Aika - Datum – Month and year	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages
Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma		Joulukuu 2011	45
Tiivistelmä - Referat – Abstract			
<p>Utaretulehdukset aiheuttavat lypsykarjoissa suuria tappioita. Tulehdusten synnyssä vetimen rakenteella on merkitystä, sillä bakteerien pääasiallinen reitti utareen maitoa tuottavaan rauhaskudokseen kulkee vetimen kautta. Runsaasta tutkimuksesta huolimatta vielä ei olla päästy yhteisymmärrykseen utareterveyden kannalta parhaasta vedinrakenteesta, eikä vanhoilla menetelmillä pystytäkään tarkastelemaan kaikkien vetimen alueiden rakenteita riittäväällä tarkkuudella.</p> <p>Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli testata uutta menetelmää: tarkastella vedintä silikonivalosten ja kolmiulotteisen (3D) digitaalisen kuvantamisen avulla. Silikonivaloksiin perustuvia morfometrisia tutkimusmenetelmiä ei ole tiettävästi aiemmin käytetty minkään pehmytkudoksen jäljentämisessä. Tutkimushypoteesina oli, että mallinnusmenetelmä toistaa vetimen morfometrian tarkkuudella, jolla vetimen anatomisia ja morfometrisia piirteitä pystytään tunnistamaan ja määrittelemään aiempia tutkimuksia tarkemmin.</p> <p>Tutkimuksen aikana kerättiin teurastamoilta vedinnäytteitä yhteensä 92 lehmästä. Näistä 65 eläimen vetimet kuntosuositettiin, vedinkanavan pituus mitattiin ja vetimen ulko- ja sisäpinnalta tehtiin silikonivalokset. Sisäpinnan silikonivaloksista mitattiin Fürstenbergin rosetin halkaisija. Kuuden eläimen silikonivalokset skannattiin 3D-skannerilla. 3D-mallien avulla tarkasteltiin vedinten pinnan epätasaisuutta. Mittaustuloksia vertailtiin ei-parametrisin tilastollisin testeihin.</p> <p>Silikonivalokset ja 3D-mallit toistivat luotettavasti vetimen morfometrian. Yksittäisen eläimen vedinten todettiin olevan keskenään samankaltaisia vetimen kuntosuosituksen, vedinkanavan pituuden ja Fürstenbergin rosetin leveyden osalta. Tilastollisesti merkitsevää riippuvuutta ei löydetty kuntosuosituksen, vedinkanavan pituuden ja rosetin leveyden välille. Tulosten perusteella ne ovat siis itsenäisiä vedintä kuvaavia mittoja. 3D-mallista mitatun vetimen ulkopinnan epätasaisuuden todettiin olevan negatiivisesti riippuvainen vetimen kuntosuosituksesta.</p> <p>Menetelmää voidaan jatkossa hyödyntää laajemmin erilaisten pehmytkudosten tarkastelussa. Rosetin halkaisijassa ja morfometriassa todettiin tutkimuksessa yllättävän suuria vaihteluita (2–11 mm). Aiemmissa tutkimuksissa ei ole kuvattu Fürstenbergin rosetin morfologian vaihtelevan millään tavalla. Rosetin muodonvaihteluilla saattaa olla merkitystä vedin- ja utareterveyden kannalta.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Nauta, lehmä, vedin, morfometria, 3D-mallinnus, utaretulehdus, vedinkanava, Fürstenbergin rosetti, vedinluokittelu			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Viikin kampuskirjasto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktor och ledare – Director and Supervisor(s)			
Työn johtaja: Antti Iivanainen			
Työn ohjaajat: Juha Laakkonen, Antti Iivanainen, Satu Pyörälä, Mari Hovinen			

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	1
1.1 Tutkimuksen tarkoitus ja tavoite	2
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	4
2.1 Vetimen ulkomitat	4
2.2 Vetimen pää: vedinten kuntoluokittelu	5
2.3 Vedinkanava	7
2.4 Fürstenbergin rosetti	9
2.5 3D-mallinnus morfometrisessä tutkimuksessa	10
3 AINEISTO JA MENETELMÄT	12
3.1 Vedinnäytteiden keräys	12
3.2 Vedinten jäljennösmateriaalin valinta	12
3.3 Vedinten luokittelu, vedinkanavan mittaus ja silikonivalokset	13
3.4 Fürstenbergin rosetin anatomian arviointi	15
3.5 3D-skannaus	16
3.6 Tilastolliset menetelmät	18
4 TULOKSET	19
4.1 Menetelmän validointi	19
4.2 3D-skannaus	20
4.3 Vedinten luokittelu, vedinkanavan pituus ja rosetin halkaisija	22
4.4 OPC-arvot ja vetimen eri ominaisuuksien välinen riippuvuus	24
5 POHDINTA	27

6 KIITOKSET	32
7 LIITTEET	33
8 KIRJALLISUUSLUETTELO	37

1 JOHDANTO

Utaretulehdukset aiheuttavat edelleen lypsykarjoissa suuria tappioita, vaikka tulehdusten ennaltaehkäisyä ja hoitoa on tutkittu erittäin laajasti (Bradley 2002, Pyörälä 2002). Utaretulehduksien hoitoprosentti on edelleen korkea suomalaisessakin karjassa (Maitohygienialiitto ry 2007). Vuonna 2001 mastiitin prevalenssi suomalaisessa lypsykarjassa oli 31 % (Pitkälä ym. 2004). Kaikkiin utaretulehduksiin ei ole parantavaa hoitoa, tai tulehdus toistuu usein. Utaretulehdus on hedelmällisyyshäiriöiden ohella lypsylehmän yleisin poistosyy (Heikkilä 2006).

Tulehdusten ennaltaehkäisyssä suunnitelmallinen jalostus, hyvä hygienia ja oikeat tuotanto-olosuhteet näyttelevät merkittävää osaa. Jo navetan rakennusvaiheessa on kiinnitettävä erityistä huomiota siihen, että olosuhteet saadaan utareterveyden kannalta suotuisiksi. Jalostuksessa utareterveyttä yritetään parantaa jalostamalla ja valitsemalla utare- ja vedinrakenteeltaan hyviä eläimiä, joiden maidon soluluku on pieni. Ennaltaehkäisytyöstä huolimatta parhaitenkin hoidetuissa karjoissa esiintyy utaretulehduksia. Utaretulehdustutkimuksessa onkin vielä runsaasti työkenttää. (Maitohygienialiitto ry 2007.)

Utaretulehdusten syntymisessä vetimen kunnolla on merkitystä (Michel ym. 1974). Bakteerien pääasiallinen reitti utareen maitoa tuottavaan rauhaskudokseen kulkee vedinkanavan kautta, Fürstenbergin rosetin läpi vedinonteloon ja sieltä edelleen tiehyitä pitkin utareneljännekseen (Hamann 1987). Erilaiset rasitusmuutokset ja traumat vetimen alueella voivat altistaa utaretulehduksille, sillä rikkoutuneen vetimen kautta bakteereiden on helpompi kulkea (Breen ym. 2009, Sieber & Farnsworth 1981, Zadoks ym. 2001). Tervekin vedin joutuu kovaan rasitukseen, kun lypsyn aikana vedinkanavan läpi kulkee litroittain maitoa muutamissa minuuteissa. Lypsy aiheuttaa vetimeen sekä hetkellisiä että pysyviä rasitusmuutoksia (Neijenhuis ym. 2001b, Neijenhuis ym. 2000). Vedinkanavan tulee sulkeutua lypsyn jälkeen nopeasti, jotta bakteerit eivät pääse infektoimaan utaretta (Nickerson 1994). Vedin ja erityisesti vedinkanava siis toimii toisaalta maidon valtatienä ulos utareesta ja

toisaalta tiiviisti sulkeutuvan porttina, joka estää bakteerien kolonisaation utareeseen.

Runsaasta tutkimuksesta huolimatta ei vielä ole päästy yhteisymmärrykseen utareterveyden kannalta parhaasta vedinrakenteesta. Vetimen tärkeimmät alueet, vedinkanava ja Fürstenbergin rosetti, ovat hyvin pieniä rakenteita, joten niiden tutkiminen on jo pelkästään koonkin puolesta haastavaa.

1.1 Tutkimuksen tarkoitus ja tavoite

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli esitellä uusi menetelmä vedinten tutkimiseen ja tuoda sen kautta vanhaan ongelmaan tuore näkökulma. Tarkoituksena oli tarkastella vedintä silikonivaloksiin ja kolmiulotteiseen digitaaliseen kuvantamiseen perustuvalla menetelmällä, joka mahdollistaa vetimen pintojen muodonvaihtelujen määrällisen ja laadullisen tarkastelun. Menetelmä tarjoaa uudenlaisen keinon pinnan muotojen objektiiviseen tarkasteluun.

Silikonivaloksiin perustuvia morfometrisia tutkimusmenetelmiä käytetään hampaiden morfologian ja morfometrian tutkimiseen, mutta menetelmää ei ole tiettävästi aiemmin käytetty minkään pehmytkudoksen jäljentämisessä, joten ensimmäisessä vaiheessa menetelmän sopivuus vetimen kaltaiseen pehmytkudokseen täytyi testata.

Tutkimushypoteesina oli, että silikonivalokset kykenevät toistamaan pehmytkudoksisen vetimen morfometrian sellaisella tarkkuudella, että menetelmän avulla pystytään tunnistamaan ja määrittelemään vetimen anatomisia ja morfometrisia piirteitä aiempia tutkimuksia tarkemmin. Erityisenä kiinnostuksen kohteena olivat vetimen pään pinnan epätasaisuuden vaihtelut sekä Fürstenbergin rosetin morfometria, sillä näihin vetimen alueisiin silikonivalokset voisivat tuottaa eniten uutta lisäinformaatiota. Etenkin rosetin anatomian hahmottaminen, esimerkiksi dissekoidusta preparaatista, on perinteisin menetelmin haastavaa. Lisäksi tavoitteena oli tuottaa uutta opetusmateriaalia anatomian oppiaineeseen. Uuden menetelmän avulla saatuja tuloksia verrattiin Suomessa käytössä olevaan vedinten kuntuiluokitteluun ja vedinkanavan mittaustuloksia aiempiin tutkimuksiin.

Alun perin tavoitteena oli myös yhdistää menetelmän avulla kerätty informaatio eläinten terveystietoihin, mutta näitä ei pystytty hankkimaan.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

Vetimen rakennetta on tutkittu monin eri menetelmin. Silmämääräistä tutkimusta, palpaatiota, ultraääntä, endoskopiaa ja erilaisia histologisia menetelmiä on käytetty sekä anatomisissa että kliinisissä tutkimuksissa (Asti ym. 2011, Celik ym. 2008, Riedl ym. 2004). Uusimpiin vedintutkimusmenetelmiin kuuluu 3D-ultraääni (Franz ym. 2004), joka ei kuitenkaan ole vielä laajassa käytössä. Myös röntgentutkimusta ja elektronimikroskooppia on käytetty (McDonald 1968a ja b, Pitkälä ym. 2004). Tutkimuksissa on havainnointu vedinkanavan tärkeimpiä mittoja, vetimen solupopulaatioita, bakteerien kiinnittymisalueita, vetimen anatomiaa ja vetimen dynaamisia muutoksia lypsyn aikana ja sen jälkeen (Appleman 1973, Gyles ym. 2010, Hogan ym. 1987, Khol ym. 2006, Klein ym. 2005). Näillä menetelmillä vetimen sisäpuolen tarkan anatomian tarkastelu on kuitenkin haastavaa, koska rakenteet ovat pieniä. Vedintutkimusten tulokset ovat paikoin ristiriitaisia, eikä tutkimusten perusteella ole päästy vielä yhteisymmärrykseen siitä, millainen vedinrakenne olisi utareterveyden kannalta paras. Tutkimustuloksien ristiriitaisuuksia selittävät erot menetelmissä, otoskoossa, lypsykäytännöissä, tutkituissa roduissa, tutkimuseläinten iässä ja poikimakerroissa sekä utaretulehduksen luokittelutavoissa.

2.1 Vetimen ulkomitat

Vetimet voidaan luokitella muotonsa perusteella eri luokkiin. Muoto vaihtelee teräväkärkisen, pyöreän, tasaisen, kiekkomaisen ja sisäänpäin työntyneen välillä (Appleman 1973). Luokittelutapoja on useita, ja eri tutkimuksissa luokkien määrä vaihtelee kolmesta viiteen, joskin tyypillisin luokittelu on kolmiasteinen (Appleman 1973, Neijenhuis ym. 2001b, Seykora & McDaniel 1985). Vetimen päät ovat yleensä pyöreitä tai tasapäisiä, lähes sylinterin muotoisia (Seykora & McDaniel 1985). Neijenhuis ym. (2000) totesivat tutkimuksessaan, että 18 Holstein-rotuisesta tutkimuseläimestä 75 %:lla vetimet olivat pyöreäkärkisiä, 11 %:lla teräväkärkisiä, 13 %:lla tasaisia ja 3 %:lla kiekkomaisia.

Useammassa tutkimuksessa on havaittu, että etu- ja takavetimet ovat keskenään erilaisia mm. vetimen ja vedinkanavan pituuden ja halkaisijan suhteen (Hamann & Burvenich 1994, McDonald 1968a). Vetimen pituudella on merkitystä lähinnä koneellisen lypsyn kannalta, sillä hyvin erikokoisiin vetimiin on vaikea löytää sopivat nännikumit. Holstein-rotuisilla lehmillä vetimen pituus vaihtelee tyypillisesti neljän ja seitsemän senttimetrin välillä ja halkaisija 2,2 ja 3 senttimetrin välillä (Rogers & Spencer 1991).

2.2 Vetimen pää: vedinten kuntoluokittelu

Vetimen pään kuntoluokituksella arvioidaan silmämääräisesti ja palpaation avulla pään rasitusmuutoksia, kuten värimuutoksia, verenvuotoja, turvotuksia ja vedinkanavan aukkoa ympäröivän kudoksen paksuutta ja karkeutta (Brand ym. 1996, Capuco ym. 2000, Neijenhuis ym. 2000). Kuntoluokitusmalleja on useita erilaisia, ja niiden arvosteluasteikko vaihtelee kolmesta kahdeksaan (Brand ym. 1996, Britt & Farnsworth 1996, Chrystal ym. 1999, Fox ym. 1991, Goldberg ym. 1994, Mein ym. 2001, Neijenhuis ym. 2000, Rasmussen & Larsen 1998, Shearn & Hillerton 1996, Timms & Faust 2000, Wilson ym. 2000, Yli-Hynnilä 2001). Kuntoluokitusta käytetään hyväksi sekä utareterveys- että tutkimustyössä. Suomessa nautojen terveysseurannassa on käytetty viisiportaista vedinluokittelua (Huusko 2001, Yli-Hynnilä 2001). Vuonna 2001 etelä-pohjanmaalaisissa karjoissa hyvien eli 1-luokan vedinten osuus tiloilla oli keskimäärin 79 %, 2-luokan osuus 16 % ja huonoimman 3-luokan osuus 4 % (Huusko 2001). Vetimen pään kuntoluokitus on tärkeä työkalu utareterveydenhuollossa. Vedinten kuntoluokitusten seuranta on suunniteltu lisättäväksi nautojen terveysseurantajärjestelmän rekistereihin (Tuovinen & Yli-Hynnilä 2004.)

Vetimen pään kuntoon vaikuttavat ainakin lypsyrasitus, lehmän lypsyvaihe, ikä, lypsykone ja lypsytekniikka (Neijenhuis ym. 2000, Shearn & Hillerton 1996, Wilson ym. 2000). Lypsylehmillä vetimen pään rasitusmuutoksina nähdään tyypillisimmin hyperkeratoosia ja epiteelin hyperplasiaa. Muutos havaitaan paksuntuneena vaaleana sidekudosrenkaana vedinkanavan aukon ympärillä (Neijenhuis ym. 2000, Shearn & Hillerton 1996). Konelypselyillä lehmillä

vähäisen määrän hyperkeratoosia katsotaan olevan luonnollista ja sitä esiintyy suurella osalla karjasta (Shearn & Hillerton 1996). Tyypillisesti hyperkeratoosin määrä lisääntyy 3–4 kk:n ajan lypsykauden alussa, pysyy lähes vakiona loppulypsykaudella ja vähenee, kun lehmä on ummessa (Neijenhuis ym. 2000, Shearn & Hillerton 1996, Timms & Faust 2000). Hyperkeratoosin voimakas lisääntyminen viittaa yleensä ongelmiin joko lypsykoneessa tai lypsytekniikassa (Shearn & Hillerton 1996). Hyperkeratoosimuutoksia nähdään jonkin verran myös käsinlypselyillä (Michel ym. 1974) ja vasikoiden imemillä lehmillä (Shearn & Hillerton 1996). Eläimen vanhetessa myös hyperkeratoosin määrä lisääntyy (Neijenhuis ym. 2000). Korkeatuottoisilla lehmillä on enemmän hyperkeratoosia herumiskauden aikana kuin pienempituottoisilla lehmillä (Neijenhuis ym. 2001a). Hyperkeratoosi näyttää lisääntyvän myös, jos eläimiä lypsetään kahden kerran sijasta kolmasti päivässä (Hamali ym. 2008) tai mikäli käytetään ärsyttäviä vedinkastoliuoksia (Britten ym. 2004, Timms & Faust 2000).

Perinnöllisten tekijöiden merkitystä hyperkeratoosin muodostumisessa ei tiedetä (Shearn & Hillerton 1996), mutta arvellaan, että jotkin eläimet ovat selvästi herkempiä rasitusmuutoksille (Timms & Faust 2000). Vedinten anatomia on perintötekijöiden sanelemaa, ja tasaisissa tai hieman sisäänpäin työntyvissä vedinten päissä on pyöreitä ja suippoja vedinpäitä vähemmän rasitusmuutoksia vedinkanavan ympärillä (Neijenhuis ym. 2000, Rathore 1977).

Vetimen kunnon ja utareterveyden yhteyttä on tutkittu varsin vähän. Selvää kuitenkin on, että utaretulehdus alttius kasvaa, mikäli vedinluokitus on erittäin huono eli kun vetimen pää on rikkonainen, vedinkanavan aukon epiteeli on hiertynyt rikki tai vetimen pään hyperkeratoosi on erittäin voimakasta (Bhutto ym. 2010, Breen ym. 2009, Sieber & Farnsworth 1981). Maidon soluluvun ja vetimen hyperkeratoosin välinen yhteys ei ole yhtä selvä. Tankkimaidon soluluvun on osoitettu kohoavan, jos tilalla on vedinten kuntoa huonontavaa jatkuvaa tyhjälypsyä (Shearn & Hillerton 1996). Toisaalta useammassa tutkimuksessa maidon soluluvun ja vetimen hyperkeratoosin välillä ei ole todettu tilastollisesti merkitsevää yhteyttä (Chrystal ym. 1999, Gleeson ym. 2004, Sieber & Farnsworth 1981).

Yksittäisissä tutkimuksissa vetimen kunnan ja utareterveyden välistä yhteyttä on tutkittu myös muista näkökulmista. Utareneljänneksistä, joiden vetimessä on pinnaltaan karkea sidekudosrengas, löytyy todennäköisemmin bakteereita kuin niistä neljänneksistä, joissa tällaista kovettumaa ei ole (Garmo ym. 2011). Neijenhuis ym. (2001a) totesivat, että eri bakteerit hyötyvät eri tavoin vetimen heikosta kunnosta. Heidän tutkimuksensa mukaan lehmillä, joilla on *Enterobacter aerogenes* -mastiitti, vetimen sidekudosrenkaat ovat paksumpia ja karheampia kuin muissa kliinisissä utaretulehduksissa, ja lehmillä, joilla on *E. coli* -utaretulehdus, sidekudosrenkaita on vähemmän. Burmeister ym. (1998) totesivat kokeellisessa tutkimuksessa karhean vedinepiteelin olevan alttiimpi *S. aureuksen* kolonisaatiolle. Myllys ym. (1994) totesivat kokeellisessa tutkimuksessa epiteelin päiden hiertymien altistavan neljänneksen *Stafylokokki* -infektioille. Hyperekeratoosin ja mastiittia aiheuttavan *Str. agalactiae* -infektion välillä on myös todettu positiivinen korrelaatio (Falkenberg ym. 2004).

2.3 Vedinkanava

Vedinkanava peittää vetimen kärjen sisäpinnan vedinkanavan aukon ja vedinontelon välillä. Vedinkanavan katsotaan loppuvan Fürstenbergin rosetin alueelle. (Paulrud 2005.) Vedinkanava voidaan mitata elävältä eläimeltä joko kanavaan työnnettävällä sondilla, ultraäänen pysäytyskuvasta tai röntgenkuvasta (Khol ym. 2006, Lacy-Hulbert & Hillerton 1995, McDonald 1986a ja b). Kanavan pituutta ja leveyttä on tutkittu laajasti, mutta tulokset vaihtelevat tutkitun rodun, menetelmän ja otoksen mukaan (Bramley ym. 1992, Celik ym. 2008, Neijenhuis ym. 2001b, Weiss ym. 2004). Ristiriitaisuuksista huolimatta tutkimuksista voidaan kuitenkin löytää muutamia yhteisiä piirteitä:

Vedinkanavan keskipituus ja leveys vaihtelee roduittain (Klein ym. 2005). Keskimäärin vedinkanava on noin 11 mm pitkä (Bramley ym. 1992, Celik ym. 2008, Weiss ym. 2004). Vedinkanavan pituus voidaan mitata usealla tavalla, ja tuloksiin vaikuttaa ratkaisevasti, lasketaanko Fürstenbergin rosetti mukaan kanavaan vai ei. Tutkimuksessa, jossa Fürstenbergin rosetti oli mitattu osana kanavaa, Sveitsin ruskeilla vedinkanavan keskipituus oli 15,7 mm,

holstein-friisiläisillä 17,2 mm ja simmentaleilla 18,3 mm (Klein ym. 2005).

Vedinkanavan leveys vaihtelee välillä 1.7–2.0 mm (Klein ym. 2005).

Vedinkanava pitenee ja levenee poikimiskertojen ja lypsyrasituksen lisääntyessä (Binde & Bakke 1984, Hamann & Burvenich 1994, Khol ym. 2006, McDonald 1968b). Etuvetimien ja takavetimien välillä on eroavaisuuksia: etuvedinten vedinkanava on tyypillisesti kapeampi ja lyhyempi kuin takavetimien (Hamann & Burvenich 1994, McDonald 1968a), vaikkakaan kaikki tutkimukset eivät ole saaneet samanlaisia tuloksia (Klein ym. 2005). Muutamien tutkimuksien mukaan lehmät, joiden vetimet ovat lyhyemmät, antoivat maidon pitkäkanavaisia nopeammin ja niiden maitotuotos oli korkeampi (Celik ym. 2008, Hickman 1964, Ovesen 1972).

Vedinkanavan mitoilla näyttäisi myös olevan jonkinlainen yhteys utareterveyteen. Klein ym. (2005) havaitsivat, että terveissä utareissa oli tyypillisesti pidemmät ja kapeammat vedinkanavat kuin tulehtuneissa. Toisissa tutkimuksissa on kuitenkin löydetty viitteitä siitä, että sekä hyvin pitkät että hyvin lyhyet vedinkanavat nostaisivat utaretulehdusriskiä (Seyfried 1992). Tulos selittyy sillä, että lyhyissä vetimissä bakteereilla on helpompi reitti utareeseen, kun taas pitkissä vetimissä lypsyrasitus kasvaa suuremmaksi maidon virtauksen hidastuessa. Osassa tutkimuksista taas ei ole löytynyt selvää korrelaatiota vetimen mittojen välillä (Lacy-Hulbert & Hillerton 1995). Utaretulehduksen aiheuttajabakteerilla näyttää myös olevan merkitystä, sillä Lacy-Hulbert ja Hillerton (1995) havaitsivat kokeellisessa tutkimuksessaan, että *Str. uberis* -infektion todennäköisyys lisääntyi, jos vedinkanava oli lyhyt, kun taas *Str. agalactiae* -bakteeritartunnan kehittymiselle vedinkanavan pituudella ei näyttänyt olevan väliä.

Vedinkanavan epiteeli on keratinisoitunutta kerrostunutta levyepiteeliä. Mitä pidempi vedinkanava on, sitä enemmän siinä on myös keratiinia, sillä epiteeliä itsessään on tällöin enemmän (Paulrud & Rasmussen 2004). Epiteelin keratiinikerroksen rasvahapoilla on sekä bakteriostaattisia että bakteriosidisia ominaisuuksia (Hogan ym. 1987). Epiteelin kationiset proteiinit voivat sitoutua vedinkanavaan tunkeutuviin bakteereihin, tehden ne alttiimmiksi

osmolaarisuuden muutoksille. Lypsy ohentaa keratiinikerrosta huomattavasti, jolloin keratiinikerrokseen vaeltaneet bakteeritkin poistuvat keratiinin mukana utareesta. Keratiinikerros uusiutuu lypsyjen välillä (Bitman ym. 1991). Utareen involuution aikana vedinkanavan epiteeli ohenee tilastollisesti merkittävästi (Comalli ym. 1984). Kanavan keratiinikerros näyttää suojaavan utaretta *Str. uberis* -infektioilta (Lacy-Hulbert & Hillerton 1995).

2.4 Fürstenbergin rosetti

Fürstenbergin rosetilla tarkoitetaan vedinontelon ja vedinkanavan kapean osan väliin jäävää limakalvopoimujen peittämää aluetta (Nickerson & Pankey 1983). Fürstenbergin rosetin anatomiasta on olemassa vain vähän julkaisuja (Asti ym. 2011, Nickerson & Pankey 1983, Riedl ym. 2004). Rosetin limakalvopoimut rakentuvat sidekudoksesta, jota peittää kaksikerroksinen epiteelisolukerros (Akers 2002). Poimuja on rosetin alueella kuudesta kymmeneen kappaletta (Akers 2002). Uusimmassa Dycen anatomian oppikirjassa rosetin poimujen erottuvuus on kuitenkin kyseenalaistettu (Dyce ym. 2010). Lepotilassa rosetin poimut peittävät ainakin osittain vedinkanavan proksimaalisen aukon auttaen pitämään vedinkanavan tyhjänä maidosta lypsyjen välillä. Lypsyn tai imemisen aikaansaama paine painaa poimut kasaan, jolloin maito pääsee poistumaan vetimestä. (Reece 2009.)

Rosetin poimuissa voi esiintyä anatomisia poikkeavuuksia, kuten stenooseja, jotka haittaavat maidon poistumista utareesta. Inflammaatiot tai traumat voivat johtaa lypsyä haittaavien muutosten syntyyn. Osa muutoksista on synnynnäisiä. Saksalaisessa tutkimuksessa havaittiin että 200 tutkitusta eläimestä 26:lla esiintyy rosetin alueella stenooseja, joista 11:n voitiin todeta johtuvan traumasta (Riedl ym. 2004).

Rosetin solupopulaatio poikkeaa vetimen muista alueista. Sekä infektoitumattomissa että infektoituneissa vetimissä rosetin alueella on muihin utareen ja vetimen anatomisiin alueisiin verrattuna runsaasti puolustusjärjestelmän solukkoa, erityisesti infiltratiivisia plasmasoluja mutta jonkin verran myös monosyyttejä ja neutrofiilejä (Collins ym. 1986, Ngatia ym.

1991a, Nickerson & Pankey 1983, Nickerson & Pankey 1984). Rosetin epiteelin pintasolukko poikkeaa lisäksi paikoitellen vedinontelon pintasolukosta (Collins ym. 1986). Rosetin epiteelissä on pieniä määriä sekretorisia soluja, joiden uskotaan erittävän bakteriostaattisia aineita (Akers 2002, Reece 2009).

Rosetissa on usein bakteerikolonisaatiota. *Corynebacterium bovis* -kolonioita esiintyy terveiden vedinten rosetin poimuissa ja vedinkanavassa, vaikkakin bakteeri voi aiheuttaa myös rosetin alueen tulehduksia ja mastiitteja (Gyles ym. 2010, Ngatia ym. 1991b). Rosetin alueen tulehdukset jatkuvat usein rosetista vedinonteloon, mutta tyypillisesti ne eivät ulotu vedinkanavaan (Ngatia ym. 1991b).

2.5 3D-mallinnus morfometrisessä tutkimuksessa

3D-mallinnus tarjoaa objektiivisen menetelmän pinnanmuotojen tarkasteluun ja tuo näin kokonaan uuden ulottuvuuden anatomian tutkimiseen. 3D-malleja käytetään erilaisissa morfometrisissä tutkimuksissa, sillä niiden avulla pystytään havainnollistamaan muutoin näkymättömissä olevia rakenteita, ja tarkastelemaan rakenteiden morfologisia eroja sekä kvalitatiivisesti että kvantitatiivisesti. Hyvä esimerkki kvantitatiivisesta morfometrisestä tutkimuksesta on hampaiden luokittelu purupintojen eri taittopintojen eli eri suuntaan orientoituneiden alueiden (orientation patch count, OPC) lukumäärän avulla (Plyusnin ym. 2008). Menetelmä on mahdollistanut ruokavalioon perustuvan luokittelun ja vertailun esihistoriallisten ja nykyisten eläinten välillä. 3D-mallinnuksen tuottamaa runsasta informaatiota pystytään käsittelemään tehokkaasti maantieteelliseen satelliittipaikannukseen (geographic information systems, GIS) alun perin kehitetyin menetelmin (Plyusnin ym. 2008).

Käytetyt mallinnusmenetelmät vaihtelevat kuvauskohteen mukaan histologiasta magneettikuvantamiseen. Hampaiden morfometrian tutkimuksessa ja hammaslääketieteessä on jo pidempään hyödynnetty hammasrivin silikonivaloksista laserskannerilla tuotettuja 3D-malleja (Benazzi ym. 2008, Motohashi & Takayuki 1999). Kehon sisäisiä makroskooppisia rakenteita tutkitaan magneettikuvantamisen avulla Alzheimerin taudin aivorappeumaa

selvitettäessä (Hua ym. 2008) ja CT:n avulla keuhkojen ilmatiehyiden morfometriaa tutkittaessa (Montaudon ym. 2009). Myös histologisista leikesarjoista pystytään tuottamaan digitaalisia 3D-malleja (Arraez-Aybar ym. 1994, Sigal ym. 2009). Plastiikkakirurgian uusimpana kehitysaskeleena on 3D-valokuvaukseen perustuva rintojen muodon morfometrinen tutkimus (Chen ym. 2010). 3D-menetelmien käyttö lisääntyy jatkuvasti menetelmien kehittyessä ja tietokoneiden laskentatehon kasvaessa.

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Vedinnäytteiden keräys

Vedinnäytteitä kerättiin koko tutkimuksen aikana yhteensä 92 lypsylehmästä. Keväällä 2009 kerättiin alustavia vedinnäytteitä 12 eläimeltä Paimion teurastamolta sekä 15 eläimeltä Kauhajoen teurastamolta. Näiden alustavien näytteiden avulla kehitettiin ja testattiin tutkimusmenetelmää.

Varsinainen 65 eläimen tutkimusaineisto kerättiin Kauhajoen teurastamolta heinä- ja elokuussa 2009. Näytteitä kerättiin joka viikko kahtena satunnaisena päivänä, jokaisena päivänä teurastuslinjan kuudesta peräkkäisestä eläimestä. Keräystä varten valittiin aika, jolloin teurastetaan aikuisia lypsylehmiä, mutta muutoin ajankohta oli satunnainen. Eläinten rotu, tarkka ikä, tilatiedot ja terveystiedot ovat tuntemattomia.

Vetimet kerättiin teurastuslinjan utareenleikkauspisteen jälkeen viiltämällä vetimet irti utareesta puukolla vetimen juuren kohdalta. Lisäksi utareesta kerättiin mahdollisuuksien mukaan molemmat kaudaaliset imusolmukkeet mahdollista histologista tutkimusta varten. Eläinten korvanumerot kirjattiin, jotta eläimistä olisi myöhemmin mahdollista kerätä terveystiedot. Keräysvaiheen työvaiheiden ja kirjattavan materiaalin määrää rajoitti se, että utareenpoistopisteellä työskenteli vain yksi näytteenottaja ja teuraslinjan nopeus on noin 50 eläintä tunnissa.

3.2 Vedinten jäljennösmateriaalin valinta

Käytetty silikonimassa valittiin ennen varsinaisen tutkimuksen alkua testaamalla vedinnäytteisiin kolmea 3M-yhtiön valmistamaa suhteessa 1:1 sekoitettavaa kaksikomponenttijäljennösmassaa: ESPE Express™ 2 Light Body Flow Quick, ESPE Express™ 2 Ultra-Light Body Quick, ESPE Express™ 2 Light body Standard Quick. Kaikkien testattujen massojen työstöaika on puolitoista minuuttia ja konsistenssi kevyt ja puristukseen soveltuva. Valosmateriaaliksi valittiin lopulta alhaisen viskositeetin wash-silikonimassa Express™ 2 Light

Body Standard Quick. Valittu massa on koostumukseltaan erittäin vetoluja, joustavaa, sitkoista, elastisesti palautuvaa ja hydrofiilista. Massa on 3M:n hammasjäljennösmassoista hydrofiilisin ja yksi valmistajan juoksevimmist massoista. Hydrofiilisyyden takaa, että silikonijäljennöksen ja kudoksen väliin ei jää nestekuplia vaan neste leviää ohueksi filmiksi. Hydrofiilisyyden on tärkeää, koska pehmytkudosten pinnalla on aina jonkin verran nestettä, vaikka ne kuivattaisiin huolella ennen jäljentämistä. Massan juoksevuus ja elastisuus taas mahdollistavat massan puristamisen kapeaan vedinkanavaan, ilman että massa kuitenkaan valuu ulos kanavasta tai muiltakaan vetimen pinnoilta. Hyvä vetolujuus minimoi katkeamisriskin, kun valosta poistetaan vedinkanavasta.

Jäljennösmassan toimivuus varsinaisessa 3D-skannauksessa testattiin myös ennen varsinaisen tutkimuksen aloittamista skannaamalla sama valo useita kertoja ja vertaamalla saatuja tuloksia toisiinsa silmämääräisesti.

3.3 Vedinten luokittelu, vedinkanavan mittaus ja silikonivalokset

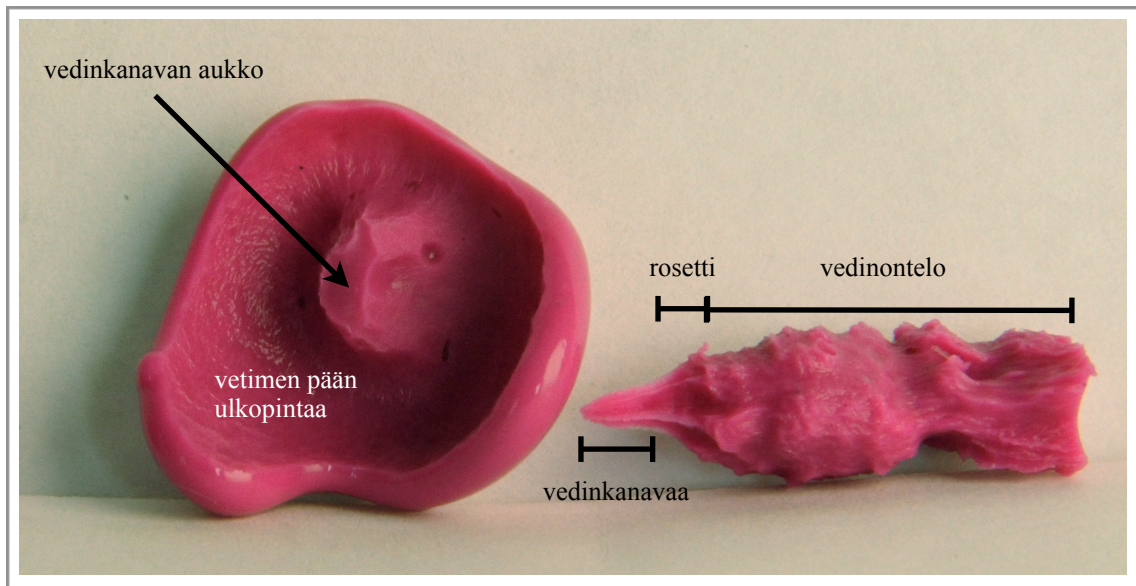
Vedinten jatkokäsittely tehtiin välittömästi keräyksen jälkeen. Yhtenä päivänä kerättiin tyypillisesti noin 6 eläimen vedinnäytteet. Erän käsittely kesti keskimäärin noin 2 tuntia kuivumisajat mukaan luettuina. Aluksi vetimet puhdistettiin kylmällä vedellä ja kuivattiin paperilla ja pumpulipuikoilla sekä vetimen ulkopinnalta että hellävaraisesti vedinontelon limakalvopinnalta. Varsinaisen tutkimusaineiston vetimet arvosteltiin lisäksi käsittelyvaiheessa silmämääräisesti maitojalosteen vedinluokitteluasteikkoa apuna käyttäen (liite 1) ja valokuvattiin. Luokiteltujen vedinten vedinkanavien pituus mitattiin käyttäen millimetrisondia (sphenometer model Gröndahl, tarkkuus 0,1 mm), joka työnnettiin vedinkanavaan, kunnes tunnettiin selkeää vastusta.

Kustakin vetimestä tuotettiin kaksi silikonivalosta, toinen vetimen ulkopinnalta vedinkanavan ympäriltä (kuva 1) ja toinen vetimen limakalvopuolelta vedinontelosta, Fürstenbergin rosetista ja vedinkanavasta (kuva 2). Molemmat valokset toistettiin 12 vetimestä menetelmän validointia varten.



Kuva 1. Yhden eläimen vetimet ja niiden ulkopinnoilta otetut silikonivalokset.

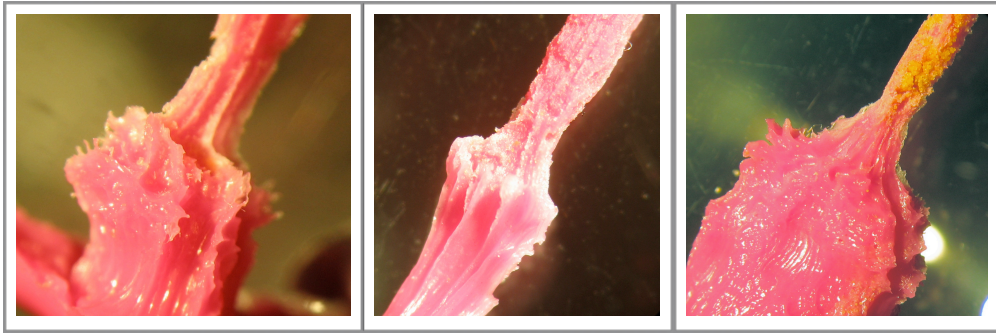
Jäljennökset tehtiin kahdessa osassa hydrofiilisella silikonijäljennysaineella, joka puristettiin tarkoitukseen valmistetulla ohutkärkisellä pistoolilla (Garant-jakelija ja sekoitekärjet, valmistaja 3M) jäljennettävälle alueelle. Vetimen ulkopinnan valos tehtiin puristamalla kaksikomponenttimassaa spiraalimaisena liikkeenä vetimen kärjen päälle. Silikonin annettiin kuivua 3–5 minuuttia, minkä jälkeen valos poistettiin. Sisävalos tuotettiin puristamalla silikonimassaa vedinonteloon, kunnes massaa saatiin näkyville vetimen toiseen päähän vedinkanavan aukolle. Vetimet jätettiin kuivumaan kyljelleen 5–10 minuutiksi. Kuivumisaika on ulkopinnan jäljennöstä pidempi, koska vedinkanavassa silikonimassalla on vähemmän hapen kanssa reagoivaa pinta-alaa. Silikonivaloksien valmius varmistettiin aina koskettamalla silikonimassaa kevyesti. Mikäli se oli edelleen pehmeää, annettiin jäljennöksen kuivua vielä muutaman minuutin ajan. Kuivumisen jälkeen vedinkanavan ulkopuolelle puristunut silikonimassa irrotettiin valoksista katkaisemalla massa saksilla niin, että jäljelle jäävä massa täytti enää vain vedinkanavan. Sisävalos poistettiin vetimestä vetämällä kevyesti vedinontelon puoleisesta päästä. Tarvittaessa vedintä manipuloitiin varovaisesti puristamalla, jotta sisävalos saataisiin mahdollisuuksien mukaan poistettua ehjänä, vedinkanavan ohuen valoksen katkeamatta.



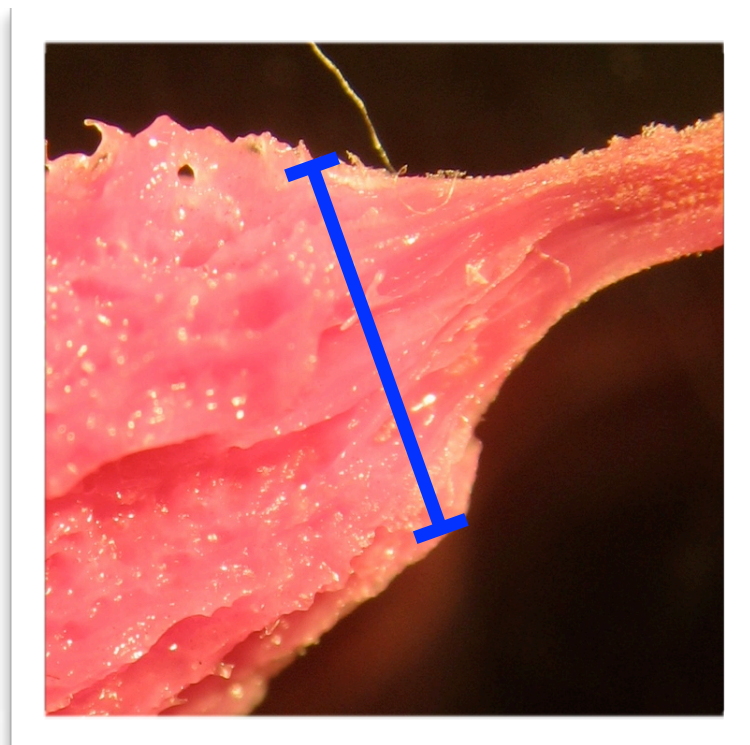
Kuva 2. Yhden vetimen ulkopinnan (vasemmalla) ja sisäpinnan (oikealla) valokset sekä se, mitä osia vetimestä kukin valos kuvaa.

3.4 Fürstenbergin rosetin anatomian arviointi

Vetmien sisäpintojen valoksissa keskityttiin rosetin muodon vaihteluiden tarkasteluun (kuvasarja 3). Morfologista vaihtelua kuvaavaksi parametriksi valittiin Fürstenbergin rosetin leveimmän alueen levein halkaisija. Kaikissa tutkituissa näytteissä Fürstenbergin rosetissa oli vain yksi selkeä leventymäkohta, jonka molemmille puolille rosetin poimut saattoivat ulottua. Rosetin poimut sijoittuivat suurimmassa osassa vetimiä vedinkanavan puolelle, vetimen distaalisimpaan osaan, jolloin rosetin levein kohta oli selkeästi rosetin ja vedinontelon rajavyöhykkeellä (kuva 4). Joissain vetimissä rosetin poimut ulottuivat vedinontelon puolelle, jolloin rosetin ja vedinontelon rajavyöhyke ei ollut selkeästi määritettävissä. Levein halkaisija mitattiin työntömitalla (valmistaja Metrica, tarkkuus 0,05 mm). Mittausvirheiden minimoimiseksi mittaus suoritettiin kahdesti kustakin rosetista ja tulokseksi valittiin mittausten keskiarvo.



Kuva 3. Vetimen sisäpinnan valoksia jotka havainnollistavat Fürstenbergin rosetin morfologista vaihtelua.



Kuva 4. rosetin mittauskohta vetimen sisäpinnan valoksessa.

3.5 3D-skannaus

Silikonivaloksia skannattiin 3D-skannerilla 6 eläimen erä, jonka tarkemmat tiedot näkyvät taulukosta 1. Skannattavaan erään valittiin vedinluokittelun ja rosetin muodon perusteella ääripäihin sijoittuvat eläimet, jotta saataisiin karkea käsitys ääripäiden morfometrian eroista.

Skannaus tehtiin Nextec Hawk 3D-laserskannerilla 30 x 30 mikrometrin resoluutiolla. Vedinten ulkopintojen silikonivalokset asetettiin käsin skannaustasolle niin, että vetimen pää oli mahdollisimman kohtisuorassa skannerin laserpäästä vastaan. Sisäpinnan mallit asetettiin skannaustasolle lappeellaan, jolloin 3D-malliin tuli vain toinen puoli (50 %) koko mallista. Valittu silikonimassa sopii 3D-skannaukseen niin hyvin, ettei valoksien pintaa tarvinnut päällystää heijastusten estämiseksi.

Skannaus tuottaa point cloud -tiedostoja, jotka jatkokäsiteltiin digital elevation model -muotoon (DEM). DEM-tiedostoja käsiteltiin edelleen Surfer-ohjelmistolla (versio 8) Alistair Evansin menetelmäohjeiden mukaisesti (Evans 2008a ja b), jotta 3D-malleista pystyttäisiin laskemaan mallin pinnan eri taitopintojen lukumäärä eli OPC (orientation patch count)(Evans ym. 2007). OPC-luku kuvaa mallinnetun pinnan epätasaisuutta. Ulkopinnan mallit leikattiin vertailukelpoisiksi valitsemalla tietty samansuuruinen pinta-ala vetimen ihoa jokaisesta mallista pyöreällä, standardikokoisella työkalulla ja leikkaamalla kaikki alueen ulkopuolelle jäävät pikselit pois. Vetimen sisäpinnan mallit leikattiin vertailukelpoiseksi muutoin samalla tavalla, mutta työkaluna käytettiin neliötä.

Taulukko 1. 3D-skannaukseen valitut näytteet, vedinluokka asteikolla 1–3.

lehmän nro	vedinten (4 kpl) vedinluokittelun vaihteluväli	vedinten (4 kpl) rosetin leveyden vaihteluväli (mm)
26	1	6,4–7,8
35	2,5–3	4,9–5,1
38	2,5	3,6–7,7
67	1	4,1–5,0
71	2,5	3,7–4,6
79	1	5,6–5,9

3.6 Tilastolliset menetelmät

Tilastolliset tutkimukset tehtiin Mac-käyttöjärjestelmässä (OS X 10.6.8) toimivilla R- (versio 2.13.1) ja Numbers-ohjelmilla (versio 2.1). Aineiston jakaumia kuvailevina lukuina annetaan varianssi, huipukkuus ja vinous.

Kolmogorov-Smirnov-testillä testattiin, onko aineisto jakautunut normaalisti.

Aineiston eri mittojen riippuvuus testattiin Kendallin tauilla joka käsittelee tasatulokset paremmin kuin Spearmanin rho eikä vaadi normaalijakautunutta aineistoa niin kuin Pearsonin product-moment-korrelaatio (Kendall 1976).

R-ohjelmistossa käytettiin cor-funktiota, jolla saatiin tarkin mahdollinen arvo Kendallin tauille. Merkitseväksi P-arvoksi valittiin alle 0,05. P-arvot laskettiin Kendall-funktiolla, sillä se antaa tarkemman tuloksen, kun tutkittavana on yli viidenkymmenen parin aineisto. Puuttuvat luvut poistettiin pareittain. Eläinten välillä parametrien riippuvuutta testattiin keskiarvotetuista luvuista.

OPC-arvot ilmoitetaan keskiarvoina, sillä Surfer manipulator -ohjelman OPC-lasku antaa 8 erillistä OPC-arvoa, jotka kukin on laskettu eri katselukulmasta (orientaatiosta). Varsinaisen OPC-laskun jälkeen jokaiselle vedinjäljennökselle lasketaan näiden kahdeksan OPC-arvon keskiarvo.

Itsenäisten populaatioiden erojen, esimerkiksi 1-luokan ja 2,5-luokan OPC-arvojen eroavaisuuksien, tarkastelemiseksi käytettiin Mann-Whitney U -testiä.

4 TULOKSET

4.1 Menetelmän validointi

Puristettava Express™ 2 Light Body Standard Quick -jäljennösmassa toisti vetimen pintarakenteen kokonaisuudessaan hyvin. Toistetuissa muoteissa havaittiin eroja, mikäli valoksen ja vetimen pinnan väliin oli jäänyt vettä tai ilmaa (kuva 5). Vetimissä esiintyi myös jonkin verran papilloomia, jotka jäljentyivät muotteihin (kuva 6). Valmiissa jäljennöksessä papilloomia muistuttaa ilmakuplaa. Ilman jäämisen mahdollisuus voitiin minimoida käyttämällä huolellista jäljennöstekniikkaa (spiraalimainen pursotusliike) ja veden jääminen kuivaamalla mallinnettavat vetimenpäät. Vetimen pinnan vähäinen kosteus ei haitannut jäljennöksissä. Käytetyn jäljennösmassan ainut heikkous oli, että kapea vedinkanavan osuus vetimen sisäpinnan valoksissa katkesi herkästi massan hyvästä vetolujuudesta huolimatta, kun valosta irrotettiin näytteestä.



Kuva 5. Kaksi samasta vetimestä tehtyä ulkopinnan silikonivalosta, joissa on ilmakuplien jättämiä aukkoja.

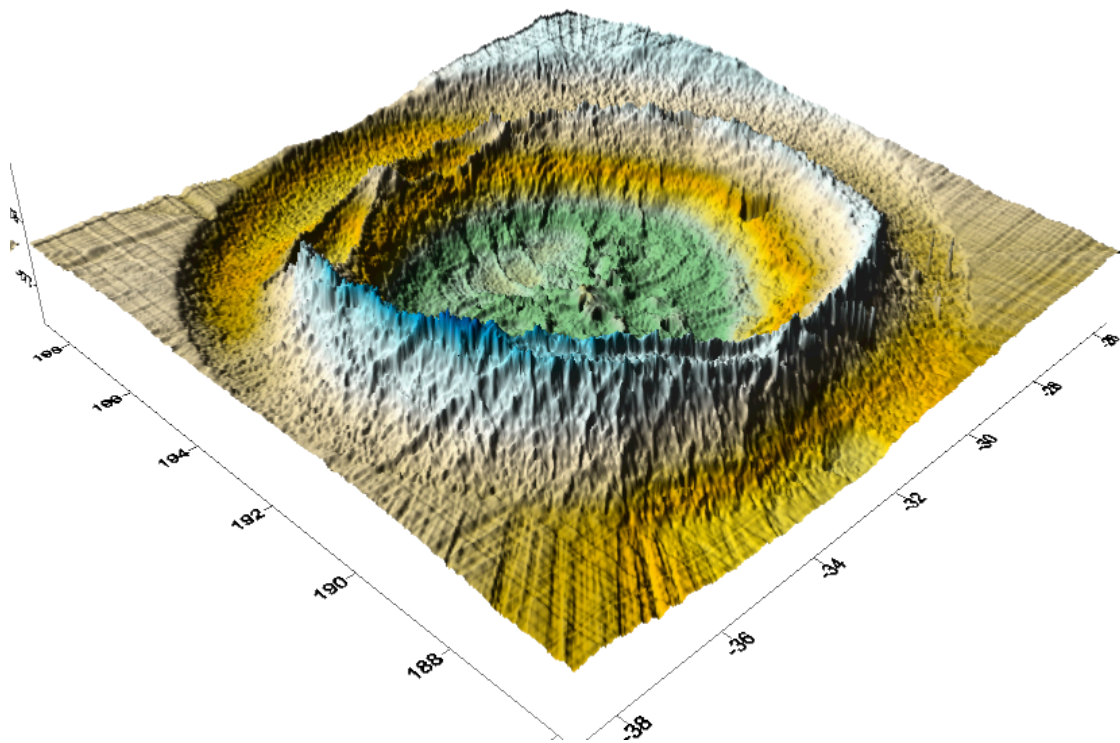
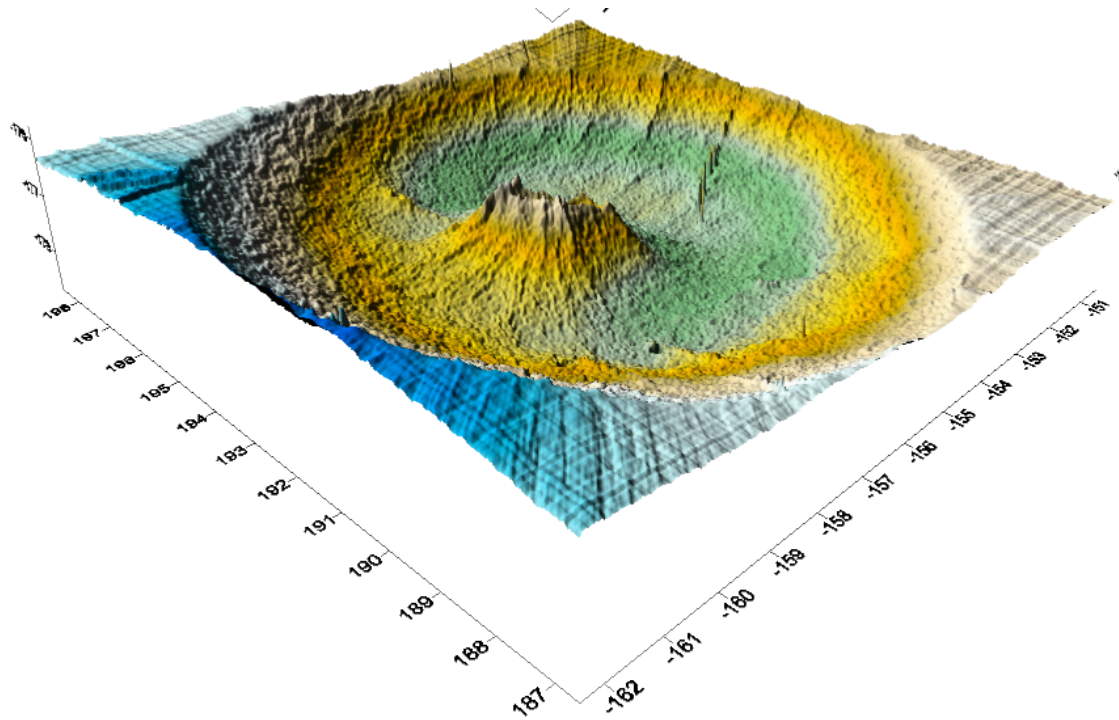


Kuva 6. Silikonijäljennös vetimestä, jossa papilloomia.

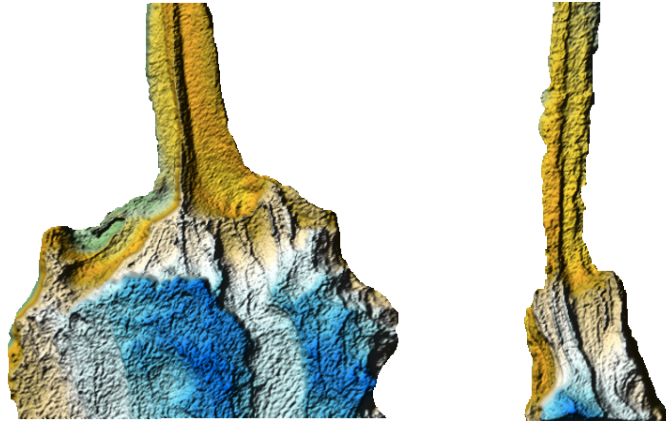
Valittu Express™ 2 Light Body Standard Quick -jäljennösmassa toimi hyvin myös skannausvaiheessa. Samasta vetimen ulkopinnan valoksesta toistetuissa skannauksissa ei todettu silmämääräisesti merkittäviä eroja. Jäljennösmassan vaaleanpunainen väri heijasti valoa niin vähän, ettei valoksien päälle tarvinnut normaaliresoluutiolla skannattaessa sumuttaa mustaa päällystysainetta.

4.2 3D-skannaus

Kuudesta eläimestä skannattujen ulkopinnan valoksien perusteella pystyttiin visualisoimaan erittäin tarkasti vetimenpään morfometria ja pinnanrakenne. Skannauksen tuloksena saaduista 3D-malleista pystyy hahmottamaan hyvin vedinkanavan aukon ja aukkoa mahdollisesti reunustavat epiteelirenkaat, jotka liittyvät vedinluokitteluun. Kuvassa 7 on vertailun vuoksi esitetty vedinluokittelun kaksi ääripäätä. Luokan 2,5 3D-mallinnuksesta voidaan selvästi erottaa pinnan lisääntynyt epätasaisuus sekä kohonneet rengasmaiset alueet. Luokan 1 vetimen pinta sen sijaan on tasainen ja vailla rengasmuodostumia. Kuvassa 8 nähdään vastaavasti kaksi vetimen sisäpinnan morfologista ääripäätä. Kaikkien skannattujen vedinten värikartat löytyvät liitteestä 2.



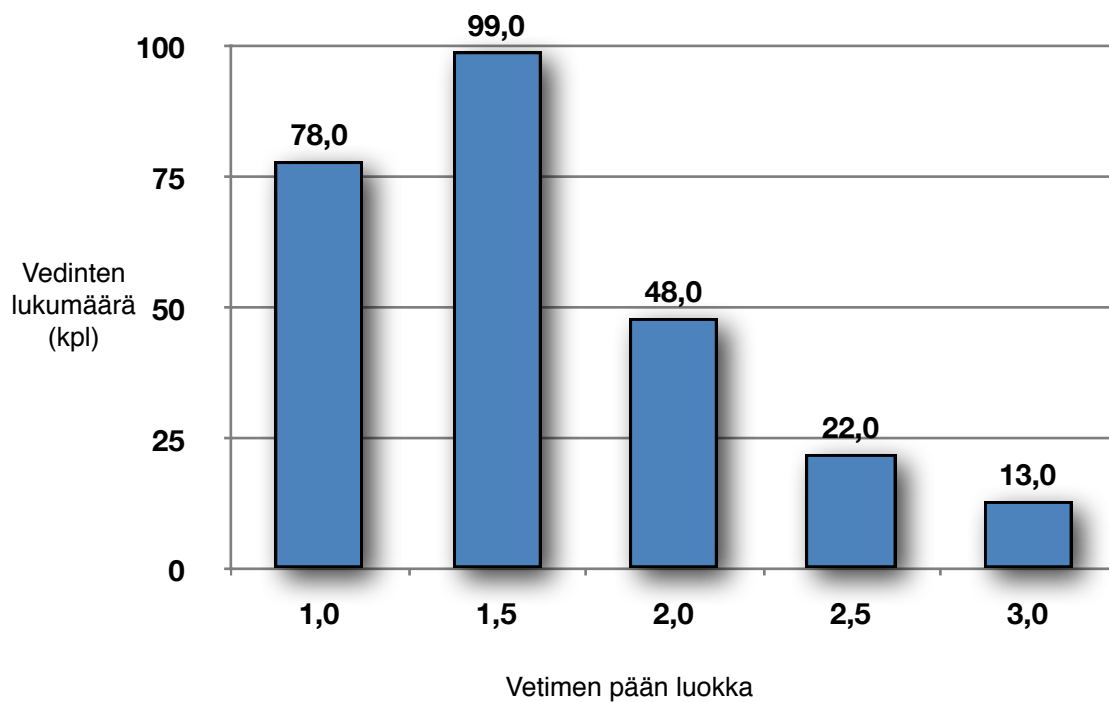
Kuva 7. 3D-mallinnus kahden eri vetimen pään silikonimalleista. Ylempänä vedin, jolle annettu vetimen pään luokittelussa luokka 1, alempana luokan 2,5 vedin. Väritykset kuvaavat valokseen korkeuseroja.



Kuva 8. 3D-mallinnus kahden vetimen sisäpinnan silikonivaloksista, kuvat mittakaavassa toisiinsa nähden. Värit kuvaavat valoksien korkeuseroja.

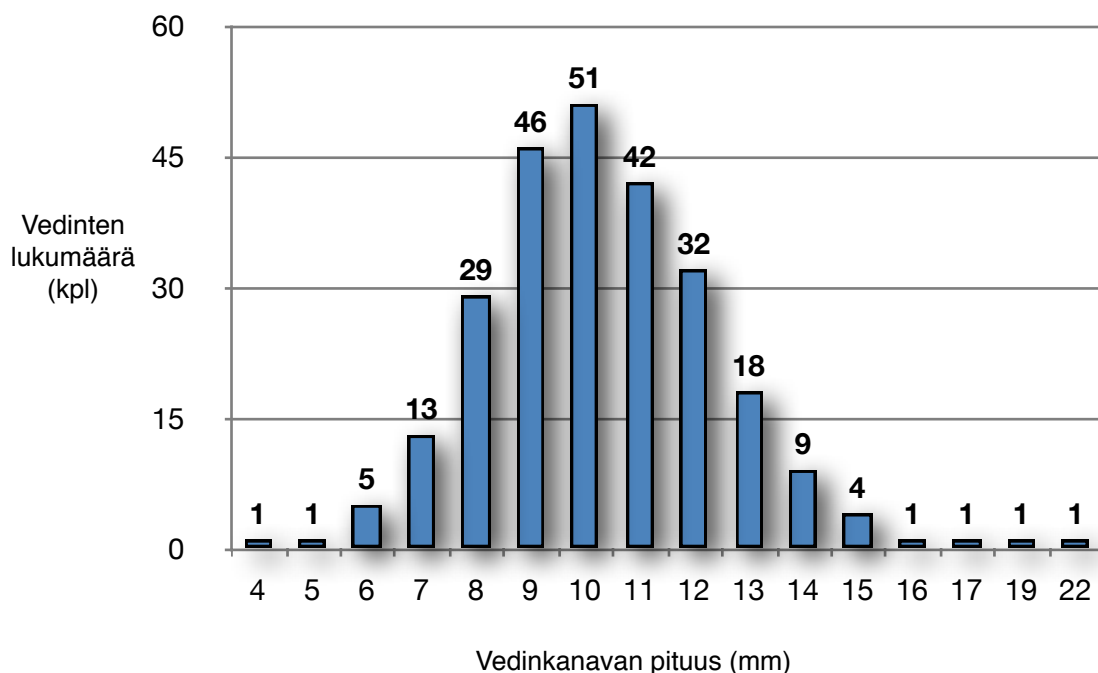
4.3 Vedinten luokittelu, vedinkanavan pituus ja rosetin halkaisija

Vedinluokittelu tehtiin kaikista varsinaisen tutkimusaineiston 62 eläimestä eli yhteensä 260 vetimestä. Vedinluokittelun mediaani on 1,5. Huipukkuus on 123,38, vinous 9,301 ja varianssi 0,309. Vedinluokittelun jakauman näkee kuvaajasta 1. Prosentuaalisesti 1-luokkaan kuului 30 % vetimistä, 1,5-luokkaan 38,80 %, 2-luokkaan 18,46 %, 2,5-luokkaan 8,46 % ja huonoimpaan 3-luokkaan 5,00 %.



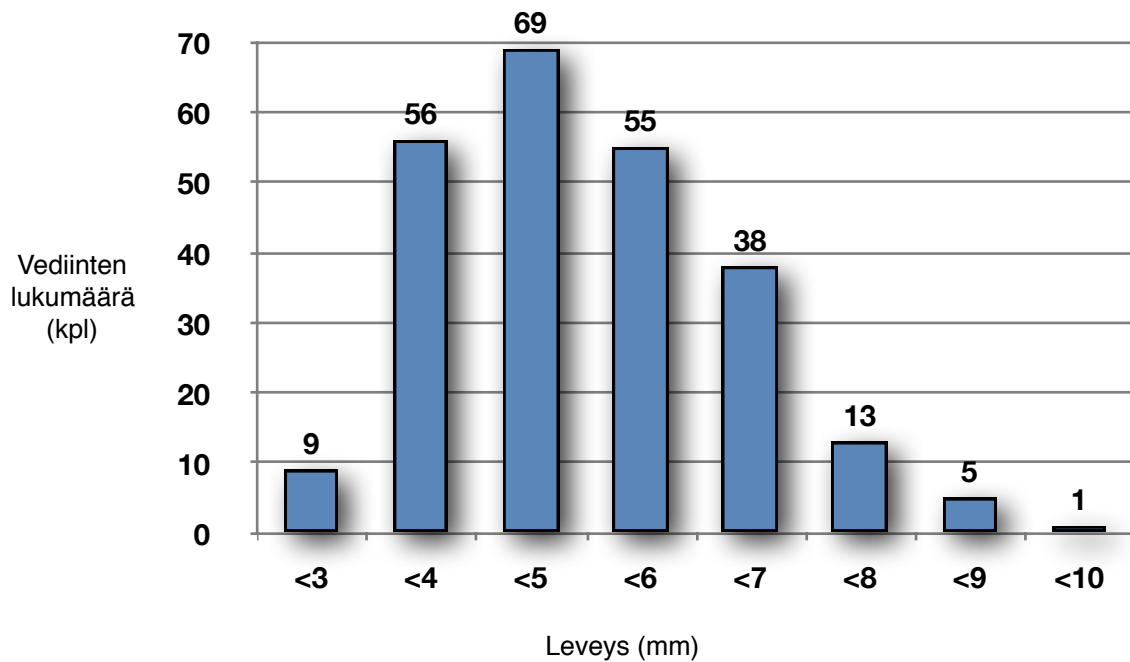
Kuvaaja 1. Vedinluokittelu (1–3).

Vedinkanavan pituus voitiin mitata yhteensä 255 vetimestä. Viidessä vetimessä vedinkanava oli joko ummessa tai anatomisesti siinä määrin poikkeava, että sitä ei voitu mitata. Vedinkanavan keskimääräinen pituus on tutkimusaineistossa 10,30 mm (keskivirhe 0,141 mm). Huipukkuus on 6,037, vinous 0,845 ja varianssi 0,309. Vedinkanavan pituuden jakauman näkee kuvaajasta 2. Vedinkanavan jakauma on lievästi vino vasemmalle, eikä jakauma siis ole normaali (Kolmogorov-Smirnov-testin p-arvo < 0,001). Vedinkanavan leveyttä ei tässä tutkimuksessa mitattu.



Kuvaaja 2. Vedinkanavan pituus.

Fürstenbergin rosetin leveimmän kohdan halkaisija pystyttiin mittaamaan 246 vetimestä. Neljästätoista vetimestä ei saatu rosetin alueelta tyydyttävää silikonivalosta vedinkanavan tai vedinontelon tukkeutumisen tai anatomisen poikkeavuuden takia, eikä niistä siksi voitu tehdä rosetin halkaisijan mittausta. Leveimmän kohdan halkaisijan keskiarvo on 4,9780 mm (keskivirhe 0,8590 mm). Huipukkuus on 3,150, vinous 0,543 ja varianssi 1,815. Jakauma ei ole normaali (Kolmogorov-Smirnov-testin p-arvo 0,002). Rosetin halkaisijan jakauman näkee kuvaajasta 3.



Kuvaaja 3. Fürstenbergin rosetin leveimmän kohdan halkaisija.

4.4 OPC-arvot ja vetimen eri ominaisuuksien välinen riippuvuus

3D-malleista mitatut OPC arvot vaihtelivat ulkopintojen valoksissa välillä 555–1024 (6 eläimen keskiarvo 747,75) ja sisäpintojen valoksissa välillä 290–625 (6 eläimen keskiarvo 475,4).

Kunkin yksittäisen eläimen vetimet olivat keskenään tilastollisesti merkitsevästi positiivisesti riippuvaisia toisistaan niin vetimen pään luokittelun (tau keskimäärin 0,489, p-arvo < 0,0001), ja vedinkanavan pituuden (tau keskimäärin 0,556, p-arvo < 0,0001) kuin rosetin leveydenkin (tau keskimäärin 0,512, p-arvo < 0,0001) suhteen. Eläimen sisäisen vertailun tulokset ovat liitteessä 3.

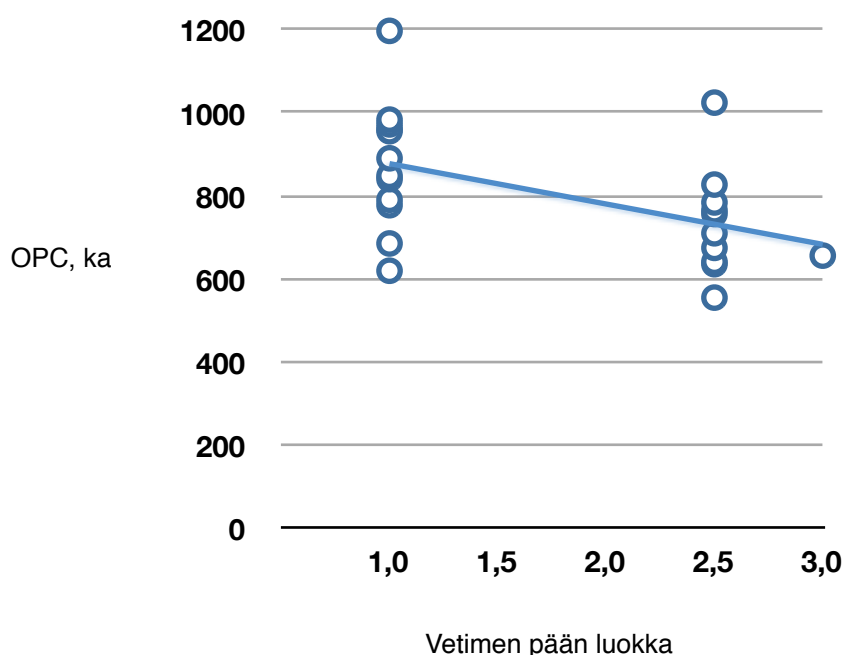
Tilastollisesti merkitsevää riippuvuutta ei pystytty osoittamaan minkään kahden mitatun parametrin (vedinluokan, vedinkanavan pituuden tai rosetin leveyden) välille (taulukko 2).

Taulukko 2. Parametrien välinen riippuvuus Kendallin taun mukaan.

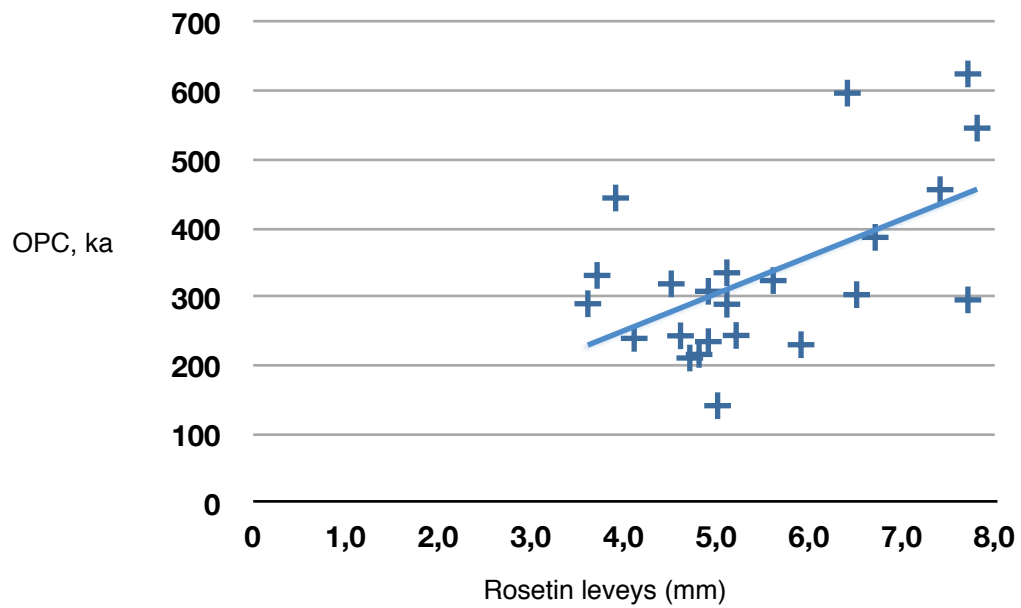
Vertailut keskiarvoluvut nautakohtaisesti	Kendallin tau	p-arvo (kaksipuoleinen)
Vedinkanavan pituus ja vetimen pään luokittelu	-0,01982063	0,83811
Vedinkanavan pituus ja rosetin leveys	-0,01022564	0,91643
Vetimen pään luokittelu ja rosetin leveys	0,01850933	0,84851

Vedinluokittelun todettiin olevan kohtalaisesti negatiivisesti riippuvainen OPC-arvosta (Kendallin tau 0,43, p-arvo 0,013) (kuvaaja 4). Vetimen sisäpinnan OPC-arvo ei ollut tilastollisesti merkitsevästi riippuvainen Fürstenbergin rosetin leveimmän kohdan halkaisijasta (Kendallin tau 0,29, p-arvo 0,07) (kuvaaja 5). Myöskään minkään yksittäisen eläimen vedinten OPC-arvojen ei todettu olevan keskenään toisistaan tilastollisesti merkitsevästi riippuvaisia (p-arvo kaikissa yli 0,05).

Vedinten ulkopintojen taittopintojen (orientation patch eli OP) pinta-alan mediaani oli 1-luokan vetimillä 16,55 ja 2,5-luokan vetimillä 20,94 pikseliä. Ero on tilastollisesti merkitsevä (Mann-Whitney U -testisuureen arvo 30, p-arvo 0,0145).



Kuvaaja 4. Vedinluokittelun (1–3) ja vetimen ulkopinnan OPC-arvon sirontakuvaaja.



Kuvaaja 5. Rosetin leveyden (mm) ja vetimen sisäpinnan mallin OPC-arvon sirontakuvaaja.

5 POHDINTA

Tutkimus toimi pilottina pehmytkudosten 3D-mallinnukselle. Tulosten perusteella voidaan todeta, että silikonivalosten käyttö soveltuu vedinten kaltaisten pehmytkudoksien tutkimiseen. Lisäksi tutkimuksessa todettiin Fürstenbergin rosetin morfometriassa olevan runsaasti vaihtelua eri eläinten välillä.

Tutkimukseen valittua Express™ 2 Light Body Standard Quick -silikonimassaa ei ole aiemmin käytetty tämänkaltaisessa 3D-mallinnuksessa. Käytetty silikonimassa toisti hyvin vetimen ulko- ja sisäpinnan rakenteet, mikäli vedin puhdistettiin ja kuivattiin riittäväällä huolellisuudella. Massa heijasti valoa hyvin vähän. Hampaiden tutkimuksessa käytetyt massat ovat heijastaneet valoa siinä määrin että mallien pinnat on jouduttu peittämään mustalla valoa heijastamattomalla aineella ennen skannausta (Jernvall J 2011, henkilökohtainen tiedonanto). Tähän tutkimukseen valitulla massalla kyseinen työvaihe jäi tarpeettomana pois.

Ajallisten rajoitteiden vuoksi tutkimuksessa pystyttiin 3D-mallintamaan vain pieni osa tutkimuksen varsinaisesta otoksesta. Otos valittiin käsin, ilman satunnaistamista, mikä laskee skannauksista saatujen OPC-tulosten tilastollista merkitsevyyttä. Käsin valittu otos mahdollisti kuitenkin vedinten morfologisten ääripäiden erojen tarkastelemisen paremmin kuin satunnainen otos. Vedinluokittelun ääripäiden 3D-mallien värikartoista pystyttiin silmämääräisesti toteamaan, että skannatussa mallissa vetimen pinnanmuodot toistuivat käytännössä virheittä (liite 2). Ensimmäisen vedinluokan vetimen 3D-malli näyttää silmämääräisesti sileämmältä kuin 2,5-luokan.

3D-mallinnuksessa ei pystytty suoraan hyödyntämään hampaiden tutkimukseen käytettyjä menetelmiä, vaan vedinmalleille piti kehittää oma 3D-skannaus- ja jatkokäsittelymenetelmä, mikä hidasti tutkimustyötä huomattavasti. Hampaiden tutkimuksessa 3D-mallit skaalataan samaan pikselikokoon ja niiden alkuperäinen mittakaava voidaan käytännössä unohtaa (Evans 2008b). Skaalauksen avulla pystytään vertaamaan hyvin erikokoisten nisäkkäiden

hampaiden OPC-arvoja objektiivisesti. Vedinnäytteiden tutkimuksessa on kuitenkin tärkeää säilyttää valittujen näytteiden mittakaava ja valita varsinaiseen OPC-laskuun kaikista vertailtavista näytteistä anatomisesti merkittävältä pinta-alaltaan yhtä suuri alue. Vain tällä tavalla pehmytkudoksen pinnanvaihtelut ovat vertailtavissa. Tutkielman työstämistä hidasti myös käytössä olevien ohjelmien (Surfer 8, Surfer manipulator) epävakaus eri käyttöjärjestelmäympäristöissä, minkä vuoksi ohjelmistoja ei voitu ajaa kuin hyvin rajatulla määrällä tietokoneita ja ohjelmien kaatuminen kesken työn oli tavallista.

OPC-tulosten vertailussa saatiin vain yksi tilastollisesti merkitsevä tulos, joka sekin oli yllättävä. Vetimenpään OPC-arvon todettiin olevan kohtalaisesti negatiivisesti riippuvainen vedinluokittelusta. Lisäksi yksittäisten taittopintojen pinta-alan mediaani oli merkitsevästi suurempi 2,5-luokan vetimissä (mediaani 20,94) verrattuna 1-luokan vetimiin (mediaani 16,55). Tulos on epäjohdonmukainen, sillä vedinluokittelun perusajatuksena on, että vetimen pään pinnan epätasaisuus ja hyperkeratoosi lisääntyy vedinluokittelun noustessa, eli taittopintojen pinta-ala pienenee. Tulos on epäjohdonmukainen myös edellisessä kappaleessa mainittujen 3D-mallien silmämääräisen tarkastelun tulosten valossa. Makroskooppisen, laadullisen tarkastelun ja määrällisen OPC-mittauksen välinen ero on kuitenkin selitettävissä. Silmämääräisesti tasainen ihonpinta on mikroskooppisesti epätasainen. Tällaisella pinnalla taittopinnat ovat kooltaan hyvin pieniä, mutta niitä on runsaasti (korkea OPC-arvo, taittopintojen pinta-alan mediaani matala). Makroskooppisesti epätasaisella pinnalla taittopintojen koko kasvaa, ja samalla tiettyyn pinta-alaan mahtuvien taittopintojen määrä laskee (matala OPC-arvo, korkea taittopintojen pinta-alan mediaani). Negatiivisen riippuvuuden merkitsevyyttä vähentää jonkin verran se, että skannattujen vedinten otos ei ollut satunnaistettu. Näytteet valittiin kuitenkin otokseen ilman minkäänlaista tietoa tulevista OPC-tuloksista, joten on mahdollista, että OPC-arvot kuvastavat myös aidosti koko otosta.

Vetimen sisäpinnan mallit jouduttiin skannaamaan kyljellään, sillä pystyasentoon asetettuna silikonivalokset olivat niin kapeita että, Nextec Hawk

3D-laserskannerin laserpää ei pystynyt tunnistamaan niitä. Valitulla skannausmenetelmällä saatiin siis hyödynnettyä vain 50 % silikonivaloksesta. Jatkotutkimuksissa olisi mielenkiintoista kehittää menetelmä, jolla vetimen koko sisämallin pystyy kuvantamaan yhtenäisesti. Rosetin leveimmän kohdan halkaisijan (mm) ja vetimen sisäpinnan 3D-mallin OPC-arvon välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää riippuvuutta. Tulos oli jossain määrin odotettu, sillä toisin kuin vedinluokittelu ja vetimenpään pinnan OPC-arvo, kuvaa rosetin leveys hyvin eri asiaa kuin sisäpinnan OPC-arvo. Otos on kuitenkin hyvin pieni. Koko aineiston kattava analyysi saattaisi paljastaa jonkinasteisen positiivisen riippuvuuden.

Fürstenbergin rosetin morfometrian tutkimus osoitti, että rosetin muodossa on varsin suurta vaihtelua eri eläinten välillä. Vedinten sisäpinnan valoksissa ja niiden 3D-malleissa nähdään myös selvästi Fürstenbergin rosetin poimut, joiden erottuvuus on kyseenalaistettu esimerkiksi uudessa Dycen ja Wensingin anatomian oppikirjassa (2010). Rosetin muodon vaihteluita kuvattiin mittaamalla rosetin levein kohta millimetrityöntömitalla. Menetelmä ei ole optimaalinen kuvaamaan pientä kolmiulotteista rakennetta, ja esimerkiksi koko aineiston kattavalla kolmiulotteisella tietokoneanalyysillä saataisiin havaitut muodonvaihtelut tilastoitua kokonaisvaltaisemmin.

Fürstenbergin rosetin morfologisiin vaihteluihin ei ole aiemmissa tutkimuksissa kiinnitetty huomiota (Akers 2002). Rosetin leveydellä ei tässä tutkimuksessa havaittu olevan yhteyttä vedinluokitteluun tai vedinkanavan pituuteen, mikä viittaa siihen, että rosetin leveys on itsenäinen vetimen morfologiaa kuvaava parametri. Koska Fürstenbergin rosetti sisältää runsaasti elimistön puolustusjärjestelmän soluja (Collins ym. 1986, Ngatia ym. 1991a, Nickerson & Pankey 1983, Nickerson & Pankey 1984), on perusteltua olettaa, että rosetti näyttelee merkittävää osaa vetimen bakteerikolonisaatioiden torjunnassa. Tulevissa tutkimuksissa olisi kiinnostavaa selvittää, onko Fürstenbergin rosetin muodolla yhteyttä vedin- ja utareterveyteen ja kuinka paljon ympäristötekijät vaikuttavat rosetin muotoon. Pienikokoisessa rosetissa on normaalikokoista vähemmän toimintapinta-alaa immuunipuolustuksen soluille, mikä saattaisi

altistaa neljänneksen utaretulehdukselle. Pienikokoinen rosetti voi myös olla suurempaa rosettia herkempi traumojen negatiivisille vaikutuksille.

Teknisistä syistä vetimet makasivat vetimen sisäosan jäljennöksen kuivuessa lappeellaan. Koska vetimien kudusrakenne on erittäin pehmeä ja joustava, painui jäljennös muodoltaan soikeaksi normaalia anatomiaa edustavan pyöreän sijaan. Soikeus aiheuttaa vinoumaa rosetin mittaustuloksiin, mutta virhettä pyrittiin pienentämään mittaamalla rosetin leveys aina silikonivaloksen kaikista leveimmältä kohdalta, jolloin kasaan painuminen tuli huomioitua kaikissa näytteissä samalla tavalla.

Vedinkanavan pituuden keskiarvo tässä tutkimuksessa oli 10,3 mm. Keskiarvo on pienempi kuin aiemmissa tutkimuksissa, lukuun ottamatta tutkimusta, jossa oli mitattu ensimmäistä kertaa poikineiden lehmien vedinkanavia (taulukko 3). Tulokset voivat selittyä sillä, että suurinosa suomalaisesta karjasta on ayshire-rotuista. Ayshirejen vedinkanavien pituutta ei ole aiemmin tutkittu järjestelmällisesti. Tutkimustuloksiin vaikuttaa myös huomattavasti, onko Fürstenbergin rosetti otettu mukaan vedinkanavaan vai ei. Tässä tutkimuksessa näin ei tehty. Myöskään vedinkanavan leveyttä ei mitattu, sillä vetimen sisäpintojen valoksien vedinkanavan kapeita alueita kuvaavat osuudet katkesivat herkästi eikä näiden osuuksien katsottu siksi olevan tarpeeksi edustavia. Katkeamisherkkyydestä johtuen myöskään vedinkanavan mittausta ei pystytty luotettavasti suorittamaan silikonimallinnuksista. Tulevissa tutkimuksissa olisi hyödyllistä kehittää menetelmä, jolla vetimen sisäpinnan malli saadaan poistettua ilman riskiä katkeamisesta.

Vedinkanavan pituus ei ollut yhteydessä vetimen pään luokkaan. Pitkä vedinkanava lisää lypsyrasitusta, minkä vuoksi voisi ajatella vedinluokittelun olevan huonompi vetimissä, joiden vedinkanava on pitkä. Vedinkanavan pituus on kuitenkin vain yksi monista vetimen kuntoon mahdollisesti vaikuttavista tekijöistä. Vetimen hyperkeratoosin määrään ja epiteelin karheuteen vaikuttavat esimerkiksi nännikumin sopivuus, tyhjälypsy ja poikimiskerta (Neijenhuis ym. 2000, Shearn & Hillerton 1996, Wilson ym. 2000).

Taulukko 3. Eri tutkimuksien vedinkanavan mittaustuloksia.

* Fürstenbergin rosetti luettu osaksi vedinkanavaa

X nimettyjen rotujen risteytys

Julkaisu	rotu	otos (eläintä)	pituus (mm) ka	leveys (mm) ka
Neijenhuis ym. 2001b	holstein	18	11,09	ei mitattu
Weiss ym. 2004	sveitsin ruskea X saksan braunvieh	38	11	ei mitattu
Klein ym. 2005*	sveitsin ruskea	87	15,70	2,00
	holstein-friisiläinen	68	17,20	1,70
	simmental	83	18,30	1,80
	simmental X red pied	31	18,60	1,90
Paulrud 2005	tanskan holstein, poikunut kerran	30	10,20	3,20
	tanskan holstein, poikunut kahdesti	30	11,30	3,20
Celik ym. 2008	sveitsin ruskea	100	11,50	ei mitattu
Vesterinen 2011	ayshire, friisiläinen ja holstein-friisiläinen	65	10,30	ei mitattu

Tutkimuksen näytemateriaali ei edusta täydellisesti normaalia nautapopulaatiota. Teurastettavat eläimet ovat tyypillisesti useamman kerran poikineita nautoja, jotka poistetaan karjasta joko sairauden tai korkean iän vuoksi. Koska utaretulehdus on yksi yleisimmistä poistossyistä, otannassa on mitä todennäköisimmin normaalia nautapopulaatiota enemmän utaretulehduksesta kärsiviä eläimiä. Eläinten poikimiskerrat, utareterveys ja ikä vaikuttavat vetimiin, joten aineiston pohjalta tehtyjen päätelmien soveltaminen koko nautapopulaation tulee tehdä harkiten. Teurastamomateriaalin käytön oletettiin johtavan myös siihen, että tutkimusaineiston vedinluokittelut olisivat normaalia nautapopulaatiota korkeampia. Vedinluokittelujen mediaani sijoittui tutkimusaineistossa kuitenkin 1,5-luokan kohdalle ja 69 % vetimistä sijoittui kahteen ensimmäiseen luokkaan, mikä on linjassa aiempien suomalaisten tutkimuksien kanssa (Huusko 2001).

Pilottitutkimuksen aikana kerättyä aineiston täydellistä analyysia ei pystytty sisältämään tähän lisensiaatintutkielmaan. Tutkimusta olisikin mielenkiintoista laajentaa koko aineiston kattavaan 3D-skannaukseen ja analyysiin. Myös vedinnäytteiden histologinen tutkimus olisi mielenkiintoista, ja silloin olisi hyödyllistä keskittyä esimerkiksi bakteerikolonioiden sijoittumiseen

vedinkanavassa ja Fürstenbergin rosetissa. Tutkimuksen alkuperäisenä tavoitteena oli yhdistää uusi menetelmä eläinten terveystietoihin, jotta vedinten morfometriaa voitaisiin verrata eläinten sairastuvuuteen. Terveystietoja ei kuitenkaan saatu käyttöön, joten valitettavasti utareterveyden yhteys vedinmorfologiaan jäi kokonaan käsittelemättä.

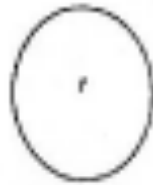
6 KIITOKSET

Kiitokset koko Helsingin Evo-Devo ryhmälle, sekä etenkin ohjaajalleni Juha Laakkoselle mielenkiintoisesta ja haastavasta poikkitieteellisestä aiheesta, menetelmän ensimmäisten validointivaiheiden teosta, opastuksesta ja tuesta. Kiitokset myös ohjaajilleni Antti Iivanaiselle, Satu Pyörälälle ja Mari Hoviselle neuvoista matkan varrella, sekä Jukka Jernvallille mahdollisuudesta työskennellä hänen innovatiivisessa ryhmässään ja avusta 3D-mallien kanssa. Kiitokset Ian Corfelle ja Teemu Häkkiselle ohjelmistojen debugaamisesta ja tuesta menetelmien suunnittelussa. Erityiskiitos Jan Mattilalle avusta tilastojen kanssa, kun itse olin ajautunut umpikujaan.

7 LIITTEET

Liite 1. Vedinluokittelu (Yli-Hyynilä 2001) ja mallivalokset vetimistä, jotka on luokiteltu kyseiseen luokkaan.

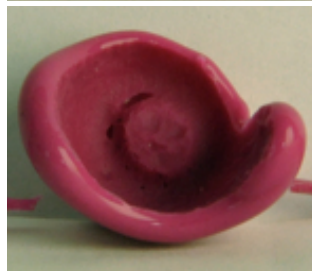
1



1,5



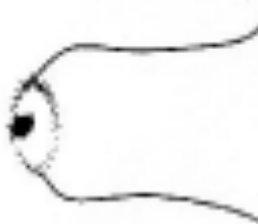
2



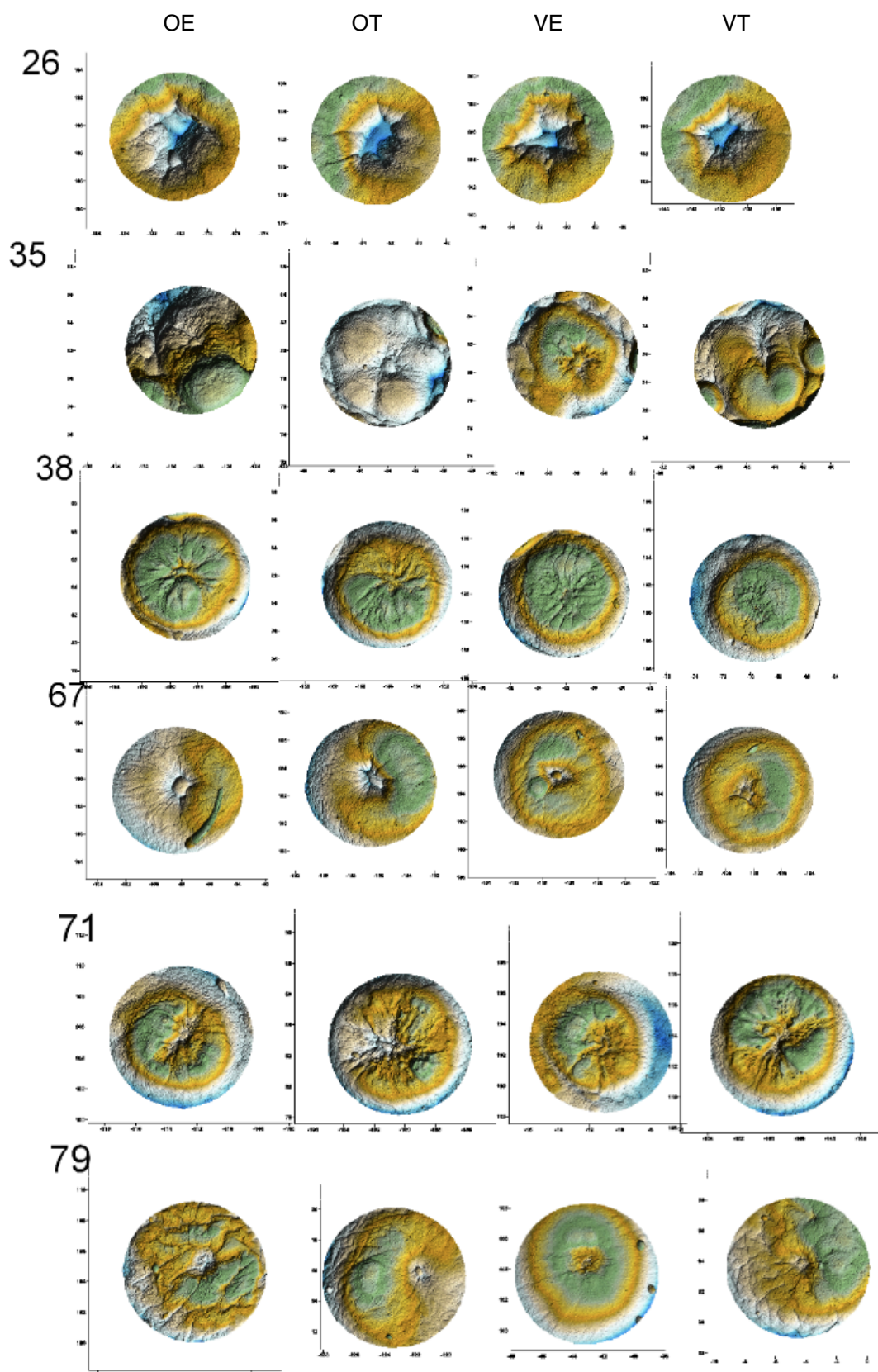
2,5



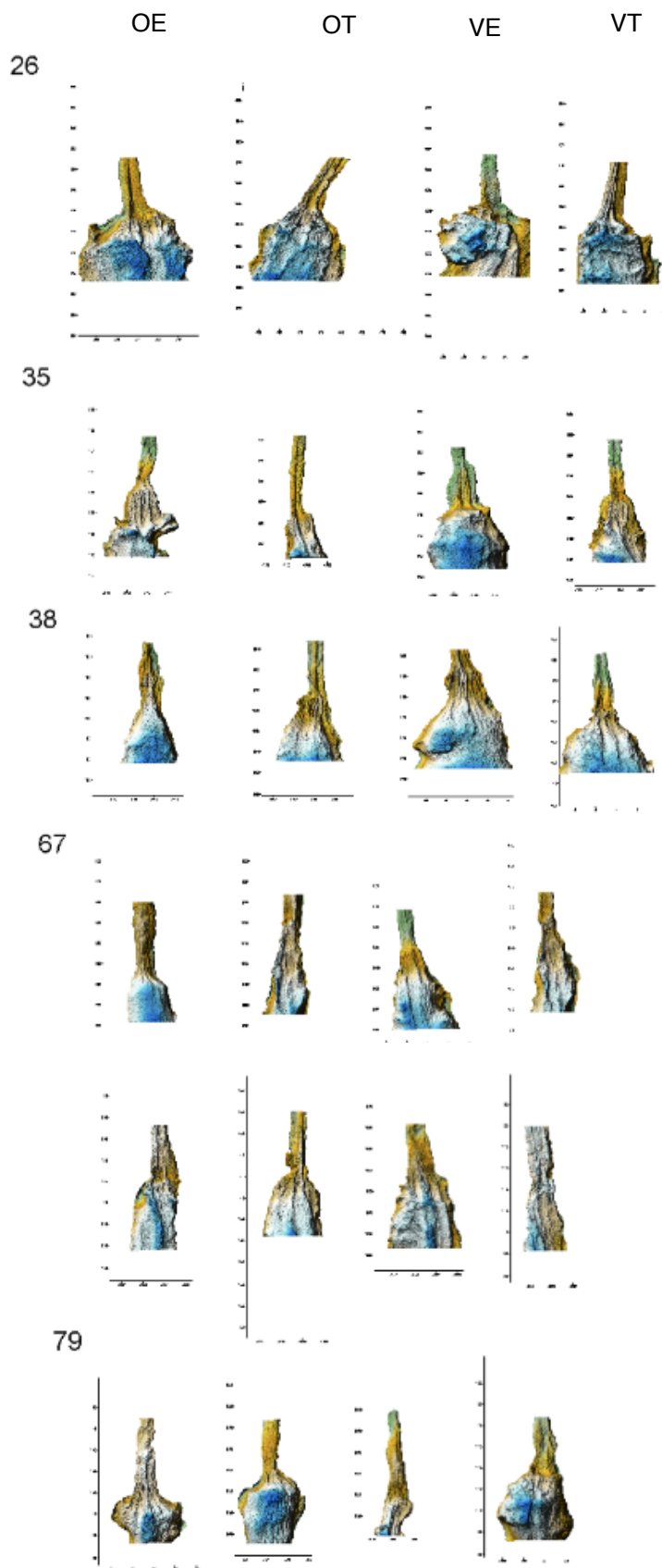
3



**Liite 2, osa 1. Skannattujen vedinten 3D-värikartat: vetimen ulkopinnat
(vetimen päät).**



Liite 2, osa 2. Skannattujen vedinten 3D-värikartat: vetimen sisäpinnat (rosetti, vedinkanava ja osa vedinonteloa).



Liite 3. Eläimen sisäiset vertailut.

Vetimen pään luokittelun vertailu eläimen sisällä vetimittäin	Kendallin tau	p-arvo (kaksipuoleinen)
oikea etu ja vasen etu	0,6507822	< 2,22e-16
oikea etu ja vasen taka	0,5073615	1,5497e-06
oikea etu ja oikea taka	0,6212027	< 2,22e-16
vasen etu ja oikea taka	0,4661423	9,5367e-06
vasen taka ja oikea taka	0,6174888	< 2,22e-16
vasen taka ja vasen etu	0,4717970	6,6757e-06
ka	0,55579575	

Vedinkanavan pituuden vertailu eläimen sisällä vetimittäin	Kendallin tau	p-arvo (kaksipuoleinen)
oikea etu ja vasen etu	0,5772406	< 2,22e-16
oikea etu ja vasen taka	0,4423022	4,4107e-06
oikea etu ja oikea taka	0,5497375	< 2,22e-16
vasen etu ja oikea taka	0,5203817	1,1921e-07
vasen taka ja oikea taka	0,5993686	2,22e-16
vasen taka ja vasen etu	0,3852951	9,1314e-05
ka	0,5123876166667	

Rosetin leveyden vertailu eläimen sisällä vetimittäin	Kendallin tau	p-arvo (kaksipuoleinen)
oikea etu ja vasen etu	0,4597268	7,1526e-07
oikea etu ja vasen taka	0,4052328	5,8413e-06
oikea etu ja oikea taka	0,5092538	< 2,22e-16
vasen etu ja oikea taka	0,5131729	< 2,22e-16
vasen taka ja oikea taka	0,5454004	< 2,22e-16
vasen taka ja vasen etu	0,4583836	4,7684e-07
ka	0,4818617166667	

8 KIRJALLISUUSLUETTELO

- Akers RM. Mammary development, anatomy, and physiology. Teoksessa: Lactation and the mammary gland. 1. p. Wiley-Blackwell, Iowa 2002: 109–110.
- Appleman RD. Subjective evaluation of teat canal anatomy. J Dairy Sci 1973, 56: 411–413.
- Arraez-Aybar LA, Merida-Velasco JR, Rodrigues-Vazquez J, Jimenez-Collado J. A computerised technique for morphometry and 3D reconstruction of embryological structures. Surg Radiol anat 1994, 16: 419–422.
- Asti RN, Kurtdele N, Altunay H, Alabay B, Özen A, Bayraktaroglu A G. Histological and Immunohistochemical Studies on the Fürstenberg's Rosette in Cows. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2011, 17: 223–228.
- Benazzi S, Fantini M, Crescenzo FD, Persiani F, Gruppioni G. Improving the spatial orientation of human teeth using a virtual 3D approach. J Hum Evol 2008, 56: 286–293.
- Bhutto AL, Murray RD, Woldehiwet Z. Udder shape and teat-end lesions as potential risk factors for high somatic cell counts and intra-mammary infections in dairy cows. Vet J 2010, 183: 63–67.
- Binde M, Bakke H. Relationships between teat characteristics and udder health. Nordisk Veterinaermedicin 1984, 36: 111–116.
- Bitman J, Wood DL, Bright SA, Miller RH, Capuco AV, Roche A, Pankey JW. Lipid composition of teat canal keratin collected before and after milking from Holstein and Jersey cows. J Dairy Sci 1991, 74: 414–420.
- Bradley AJ. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. Vet J 2002, 164: 116–128.
- Bramley AJ, Dodd FH, Mein GA, Bramley JA. Structure of the teat and udder. Teoksessa: Machine milking and lactation. Insight Books, Newbury 1992: 37–54.

Brand A, Noordhuizen JP, Schukken YH. Monitoring udder health. Teoksessa: Herd health and production management in dairy practice. Wageningen Pers, Wageningen 1996: 351–415.

Breen JE, Green MJ, Bradley AJ. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. J Dairy Sci 2009, 92: 2551–2561.

Britt JS, Farnsworth R. A system for evaluating teat anatomy, skin condition and teat ends. Proceedings of the 35th Annual Meeting of National Mastitis Council, Nashville, TN USA, 1996: 228–231.

Britten, Hansen AN, Pradraza J. Effect of teat dips on hyperkeratosis. Proceedings of the 43rd Annual Meeting of National Mastitis Council, Charlotte, NC USA, 2004: 286–7.

Burmeister J, Fox L, Hillers J, Hancock D. A comparison of two methods of evaluation of teat skin pathology. J Dairy sci 1998, 81: 1904–1909.

Capuco AV, Wood DL, Quast JW. Effects of teatcup liner tension on teat canal keratin and teat condition in cows. J Dairy Sci 2000, 67: 319–327.

Celik HA, Aydin I, Colak M, Sendag S, Dinc DA. Ultrasonographic evaluation of age related influence on the teat canal and the effect of this influence on milk yield in brown swiss cows. Bull Vet Inst Pulawy 2008, 52: 245–249.

Chen D, Chittajallu DR, Passalis G, Kakadiaris IA. Computational Tools for Quantitative Breast Morphometry Based on 3D Scans. Ann Biomed Eng 2010, 38: 1703–1718.

Chrystal MA, Seykora AJ, Hansen LB. Heritabilities of teat end shape and teat diameter and their relationships with somatic cell score, J Dairy Sci 1999, 82: 2017–2022.

Collins RA, Parsons KR, Bland AP. Antibody-containing cells and specialized epithelial cells in the bovine teat. Res Vet Sci 1986, 41: 50–55.

Comalli MP, Eberhart RJ, Griel LC, Rothenbacher H. Changes in the microscopic anatomy of the bovine teat canal during mammary involution. *Am J Vet Res* 1984, 45: 2236–2242.

Dyce KM, Sack WO, Wensing CJ. The pelvis and reproductive organs of the ruminant. *Teoksessa: Textbook of Veterinary Anatomy*. 4. p. Saunders, Missouri 2010: 722–724.

a) Evans A. 3D Scan Processing Procedures for Surfer. Instructions version 1.0 2008. <http://users.monash.edu.au/~arevans/software.html>, haettu 1.3.2010.

b) Evans A. OPC for SurferManipulator Instructions. Instructions Version 1.1 2008. <http://users.monash.edu.au/~arevans/software.html>, haettu 5.9.2011.

Evans AR, Wilson GP, Fortelius M, Jernvall J. High-level similarity of dentitions in carnivorans and rodents. *Nature* 2007, 445: 78–81.

Falkenberg U, Tenhagen BA, Baumgartner B, Heuwieser W. Relationship between characteristics of teat duct and prevalence of intramammary infections with *Streptococcus agalactiae* in udder quarters of dairy cows. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 2004, 111: 355–358.

Fox LK, Nagy JA, Hillers JK, Cronrath JD, Ratkowsky DA. Effects of postmilking teat treatment on the colonization of *Staphylococcus aureus* on chapped teat skin. *Am J Vet Res* 1991, 52: 799–802.

Franz S, Hofmann-Parisot MM, Baumgartner W. Evaluation of three-dimensional ultrasonography of the bovine mammary gland. *Am J Vet Res* 2004, 65: 1159–1163.

Garmo RT, Waage S, Reksen O, Sviland S. Relationship between teat end shape and callosity ring and mastitis bacteria isolated in quarters of Norwegian Red cows. *Proceedings of the 2011 European Buiatrics Forum, Marseille, France, 2011: 107.*

Gleeson DE, Meaney WJ, O'Callaghan JE, Rath VM. Effect of teat hyperkeratosis on somatic cell counts of dairy cows. *Intern J Appl Res Vet Med* 2004, 2: 115–122.

Goldberg JJ, Murdough PA, Howard AB, Drechsler PA, Pankey JW, Ledbetter GA, Day LL, Day JD. Winter evaluation of postmilking powdered teat dip. *J Dairy Sci* 1994, 77: 748–758.

Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4. p. Wiley-Blackwell, Iowa 2010.

Hamali H, Mosafery S, Mohammadi A. A Survey of Teat End Hyperkeratosis Prevalence in the Tabriz Dairy Herds. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2008, 7: 949–952.

Hamann J, Burvenich C. Physiological status of bovine teat. *Bull Int Dairy Fed* 1994, 297: 3–12.

Hamann J. Effect of Machine Milking on Teat End Condition: A Literature Review. *Bull Int Dairy Fed* 1987, 215: 33–49.

Heikkilä A-M. Kestävä lehmä. Lypsylehmien poiston syyt ja kestävyys taloudellinen merkitys. MTT:n selvityksiä 112. MTT, Helsinki 2006.

Hickman CG. Teat shape and size in relation to production characteristics and mastitis in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1964, 47: 777–782.

Hogan JS, Pankey JW, Duthie AH. Growth inhibition of mastitis pathogens by long-chain fatty acids. *J Dairy Sci* 1987, 70: 927–934.

Hua X, Leow AD, Lee S, Klunder AD, Toga AW, Lepore N, Chou Y-Y, Brun C, Chiang M-C, Barysheva M, Jack CR, Bernstein MA, Britson PJ, Ward CP, Whitwell JL, Borowski B, Fleisher AS, Fox NC, Boyes RG, Barnes J, Harvey D, Kornak J, Schuff N, Boreta L, Alexander GE, Weiner MW, Thompson PM. 3D characterization of brain atrophy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment using tensor-based morphometry. *Neuroimage* 2008, 41: 19–34.

Huusko M. Lypsylehmien vedinten päiden kunto ja utareterveys
Etelä-Pohjanmaan terveydenhuoltoprojektissa 1998. Lisensiaatintutkielma,
Helsingin yliopisto, Helsinki 2001.

Kendall MG. Rank Correlation Methods. 4. p. Griffin, USA 1976.

Khol JL, Franz S, Klein D, Lexer D, Waiblinger S, Luger K, Baumgartner W.
Influence of milking technique and lactation on the bovine teat by means of
ultrasonographic examination. Berliner und Münchener tierärztliche
Wochenschrift 2006, 119: 68–73.

Klein D, Flöck M, Khol JL, Franz SP, Stüger H, Baumgartner W.
Ultrasonographic measurement of the bovine teat: breed differences, and the
significance of the measurements for udder health. J Dairy Res 2005, 72: 296–
302.

Lacy-Hulbert SJ, Hillerton JE. Physical characteristics of the bovine teat canal
and their influence on susceptibility to streptococcal infection. J Dairy Res 1995,
62: 395–404.

Maitohygienialiiton utareterveystyöryhmä 2005–2010. Mietintö 14.6.2007.
Maitohygienialiitto ry, Helsinki 2007.

a) McDonald JS. Radiographic method for anatomic study of the teat canal:
observations on 22 lactating dairy cows. Am J Vet Res 1968, 29: 1315–1219.

b) McDonald JS. Radiographic method for anatomic study of the teat canal:
changes with lactation age. Am J Vet Res 1968, 29:1207–1210.

Mein GA, Neijenhuis F, Morgan WF, Reinemann DJ, Hillerton JE, Baines JR,
Ohnstad I, Rasmussen MD, Timms L, Britt JS, Farnsworth R, Cook N, Hemling
T. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1.
non-infectious factors. Proceeding of the 2nd International Symposium on
Mastitis and Milk Quality, Vancouver, Canada 2001: 347–351.

Michel G, Seffner W, Schulz J. Hyperkeratosis of teat duct epithelium in cattle.
Mh Vet Med 1974, 29: 570–574.

Motohashi N, Takayuki K. A 3D computer-aided design system applied to diagnosis and treatment planning in orthodontics and orthognathic surgery. *Eur J Orthod* 1999, 21: 263–274.

Montaudon M, Berger P, Lederlin M, Marthan R, Tunon-De-Lara JM, Laurent F. Bronchial morphometry in smokers: comparison with healthy subjects by using 3D CT. *Eur Radiol* 2009, 19: 1328–1334.

Myllys V, Honkanen-Buzalski T, Virtanen H, Pyörälä S, Muller HP. Effect of abrasion of teat orifice epithelium on development of bovine staphylococcal mastitis. *J Dairy Sci* 1994, 77: 446–452.

Neijenhuis F, Barkema HW, Hogeveen H, Noordhuizen JP. Classification and longitudinal examination of callused teat ends in dairy cows. *J Dairy Sci* 2000, 83: 2795–2804.

a) Neijenhuis F, Barkema HW, Hogeveen H, Noordhuizen JP. Relationship between teat-end callosity and occurrence of clinical mastitis. *J Dairy Sci* 2001, 84: 2664–2672.

b) Neijenhuis F, Klungel GH, Hogeveen H. Recovery of cow teats after milking as determined by ultrasonographic scanning. *J Dairy Sci* 2001, 84: 2599–2606.

a) Ngatia T, Jensen N, Berg B. Microscopic changes in infected bovine teats. *Brit Vet J* 1991, 147: 133–139.

b) Ngatia T, Jensen N, Berg B. Changes in the bovine udder quarters naturally infected by *corynebacterium bovis*. *Brit Vet J* 1991, 147: 463–468.

Nickerson SC. Bovine mammary gland: structure and function; relationship to milk production and immunity to mastitis. *Agri-Practice* 1994, 15: 8–18.

Nickerson SC, Pankey JW. Cytologic observations of the bovine teat end. *Am J Vet Res* 1983, 44: 1433–1441.

Nickerson SC, Pankey JW, Neutrophil migration through teat end tissues of bovine mammary quarters experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. J Dairy Sci 1984, 67: 826–834.

Ovesen E. Milking ability in relation to size and shape of teats. Anim Prod 1972, 15: 251–257.

Paulrud CO. Basic Concepts of the Bovine Teat Canal. Vet Res Commun 2005. 29: 215–245.

Paulrud CO, Rasmussen MD. How teat canal keratin depends on the length and diameter of the teat canal in dairy cows. J Dairy Res 2004, 71: 253–255.

Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001 - prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J Dairy Sci 2004, 87: 2433–2441.

Plyusnin I, Evans A, Karne A, Gionis A, Jernvall J. Automated 3D Phenotype Analysis Using Data Mining. PloS One 2008, 3: e1742.

Pyörälä S. New strategies to prevent mastitis. Reproduction of domestic animals 2002, 37: 211–216.

Rasmussen MD, Larsen HD. The effect of post milking teat dip and suckling on teat skin condition, bacterial colonisation and udder health. Acta vet scand 1998, 39: 443–452.

Rathore AK. Teat shape and production associated with opening and prolapse of the teat orifice in Friesian cows. Br Vet J 1977, 133: 258–262.

Reece WO. Lactation. Teoksessa: Functional anatomy and physiology of domestic animals. 4. p. Wiley-Blackwell, Iowa, 2009: 442–456.

Riedl J, Kiossis E, Muller M, Seidl S, Stolla R, Hermanns W. Endoscopic, macroscopic and histologic findings of the bovine teat. 2. Fürstenberg's Rosette. Deutsche tierärztliche wochenschrift 2004, 111: 423–429.

Rogers GW, Spencer SB. Relationship among udder and teat morphology and milking characteristics. J Dairy Sci 1991, 74: 4189–4194.

Seyfried G. The sonographic measurement of teat structures and the significance for udder health of 'Braun- and Fleckvieh'-cows. Thesis, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria 1992.

Seykora AJ, McDaniel BT. Udder and teat morphology related to mastitis resistance: a review. J Dairy Sci 1985, 68: 2087–2093.

Shearn MF, Hillerton JE. Hyperkeratosis of the teat duct orifice in the dairy cow. J Dairy Res 1996, 63: 525–532.

Sieber RL, Farnsworth R. Prevalence of chronic teat-end lesions and their relationship to intramammary infection in 22 herds of dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 1981, 178: 1263–1267.

Sigal IA, Flanagan JG, Tertinegg I, Ethier CR. 3D morphometry of the human optic nerve head. Exp Eye Res 2009, 90: 70–80.

Timms L, Faust M. Characterization of teat end changes or lesions (winter especially) and novel approaches for prevention and therapy. Proceedings of the International Symposium on Immunology of ruminant mammary gland, Stresa, Italy 2000: 138–144.

Tuovinen V, Yli-Hynnilä M. Ehdotus Nautojen terveysseurantajärjestelmäksi. Selvitystyö, Suomen eläinterveydenhuolto, Kuopio 2004: 12.

Weiss D, Weinfurter M, Bruckmaier RM. Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. J Dairy Sci 2004, 87: 3280–3289.

Wilson DJ, Gonzalez RN, Southwick LH, Guard CL. Evaluation of an experimental milking pulsation system for effects on milking and udder health. J dairy Sci 2000, 83: 2004–2007.

Yli-Hynnilä M. Katse vetimiin päin. Nauta 2001, 5: 34–36.

Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Wellenberg GJ, Grohn YT, Schukken YH. Cow- and Quarter-Level Risk Factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* Mastitis. J Dairy Sci 2001, 84: 2649–2663.